



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**IZOLACE AKTIVNÍCH LÁTEK Z ŘAS A MOŽNOSTI JEJICH  
APLIKACE V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH**

ISOLATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM ALGAE AND THEIR APPLICATION IN COSMETIC PRODUCTS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Laura Nováková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1397/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Laura Nováková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Izolace aktivních látek z řas a možnosti jejich aplikace v kosmetických přípravcích

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Kultivace zvolených kmenů řas a izolace vybraných aktivních látek
- 2) Srovnání obsahu aktivních látek u zvolených producentů a na trhu dostupných řas
- 3) Návrh a testování kosmetického výrobku s obsahem aktivních látek z řas ve volné i enkapsulované formě

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Laura Nováková  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo štúdium obsahu aktívnych látok a antioxidačných účinkov vypestovaných mikrorias. Porovnali sme výsledky s komerčnou riasou, ktorá je voľne dostupná na trhu. V teoretickej časti bola zhrnutá problematika využitia metabolitov rias v kozmetike a stručná charakteristika použitých metód pri ich testovaní.

V experimentálnej časti boli charakterizované 3 typy extraktov (vodné, alkoholové a olejové) zo 4 druhov rias z hľadiska obsahu celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnej aktivity. Najviac aktívnych látok obsahovali práve olejové extrakty.

Všetky extrakty boli enkapsulované do lipozómov. Priemerná veľkosť nanočastíc sa pohybovala okolo 200 až 300 nm. Častice boli dostatočne stabilné aj z hľadiska dlhodobej stability. Najväčší pokles bol zaznamenaný pri olejovom extrakte vypestovanej riasy *Chlorella vulgaris*. Olejové lipozómy boli podrobené MTT testu cytotoxicity na bunkovej kultúre HaCat. Na záver bolo navrhnuté možné použitie pripravených lipozómov v anti-aging kozmetickom priemysle.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Riasy, sinice, kozmetika, biomasa, extrakty, lipozómy, enkapsulácia, emulzia, antioxidanty

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis is dedicated to the study of active substances and antioxidant effects of cultivated microalgae. We compared the results with a commercial alga that is freely available. In the theoretical part we focused on description of algal metabolites in cosmetics and a brief description of the methods used in their testing.

In the experimental part there were analyzed three types of extracts (aqueous, alcohol and oil) from 4 species of algae. It is mainly the content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity that is determined. According to the results, the highest content of active substances was found in oil extracts.

All extracts were encapsulated into liposomes. The average size of the nanoparticles was in range of 200 nm to 300 nm. The particles were stable enough also for long-term stability. The largest decrease was observed in the oil extract of the cultivated algae *Chlorella vulgaris*. The cytotoxicity of oil extracts was realized by MTT test on human cell cultures HaCaT. Finally, we concluded that the prepared liposomal particles could be used for anti-aging cosmetics.

## **KEYWORDS**

Algae, cyanobacteria, cosmetics, biomass, extracts, liposomes, encapsulation, emulsion, antioxidant

NOVÁKOVÁ, Laura. *Izolace aktivních látek z řas a možnosti jejich aplikace v kosmetických přípravcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som použila správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

*Na tomto mieste by som sa rada poďakovala svojej vedúcej bakalárskej práce, pani Ing. Petre Matouškovovej, Ph.D. za jej čas, ochotu a trpezlivosť. Taktiež by som sa chcela poďakovať Ing. Martinovi Szotkowski, Ing. Renáte Pavelkovej, Ing. Natálii Burešovej za ich cenné rady a pomoc pri spracovaní experimentálnej časti. Osobitne chcem poďakovať aj kolegyni Bc. Veronike Mariničovej za tímovú spoluprácu. Vďaka patrí aj Fakulte chemickej za vytvorenie pracovných podmienok a príležitosti realizovať laboratórnu prácu. Rovnako chcem poďakovať P. Bohu, svojej rodine a priateľom za podporu pri mojom úsilí, bez ktorých by táto práca nemohla vzniknúť.*

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
2.1	Riasy a mikroriasy .....	9
2.2	Klasifikácia rias .....	9
2.2.1	Chlorophyta (zelené riasy).....	9
2.2.1.1	Chlorella.....	10
2.3	Sinice .....	10
2.3.1	Arthrospira (Spirulina) .....	10
2.4	Princíp kultivácie mikrorias .....	11
2.4.1	Kultivácia biomasy .....	11
2.4.1.1	Teplota .....	11
2.4.1.2	Svetlo .....	11
2.4.1.3	Rozsah pH .....	11
2.4.1.4	Salinita .....	12
2.4.2	Otvorené kultivačné systémy.....	12
2.4.3	Uzavreté systémy - fotobioreaktory .....	12
2.5	Využitie metabolitov rias a siníc v kozmetike .....	12
2.5.1	Fotosyntetické pigmenty rias a mikrorias .....	12
2.5.1.1	Chlorofyl.....	12
2.5.1.2	$\beta$ -karotén.....	13
2.5.1.3	Luteín .....	13
2.5.2	Lipidy .....	13
2.5.3	Vitamíny .....	13
2.5.3.1	Vitamín E .....	13
2.5.3.2	Vitamín B2 .....	13
2.5.3.3	Vitamín B5 .....	13
2.5.4	Polysacharidy.....	13
2.5.5	Proteíny.....	13
2.6	Pleťová omladzujúca kozmetika .....	14
2.6.1	Pomocné látky.....	14
2.7	Lipozómy v kozmetike .....	14
2.7.1	Fosfolipidy .....	14
2.7.2	Príprava lipozómov .....	14
2.7.3	Metóda DLS .....	15
2.7.3.1	Stanovenie zeta potenciálu .....	15
2.7.4	Enkapsulácia aktívnych látok .....	15
2.7.5	MTT test - analýza cytotoxicity .....	15
2.8	Kozmetický základ (vehikulum) .....	15
2.8.1	Emulzie .....	15
2.9	Metódy analýzy biomasy a metabolitov .....	16
2.9.1	Extrakcia .....	16
2.9.2	Transesterifikácia .....	16
2.9.3	Absorpčná spektrometria (spektrofotometria).....	16
2.9.4	Chromatografia .....	16
2.9.4.1	Kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou - HPLC/MS .....	16
2.9.4.2	Analýza lipofilných pigmentov metódou RP/HPLC .....	16
2.9.5	Plynová chromatografia GC .....	17
3	CIELE PRÁCE .....	18

4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	19
4.1	Použité chemikálie, prístroje a materiál .....	19
4.1.1	Chemikálie použité pre kultiváciu rias a siníc .....	19
4.1.2	Chemikálie použité pre tvorbu a analýzu vodných a etanolových extraktov, olejov a lipozómov .....	19
4.1.3	Prístroje a pomôcky použité pre analýzu extraktov a lipozómov .....	19
4.2	Kultivácia mikroorganizmov .....	20
4.2.1	Vytvorenie zásobnej kultúry .....	20
4.2.2	Kultivácia rias a siníc .....	20
4.2.3	Rastové krivky .....	21
4.3	Príprava extraktov .....	21
4.3.1	Vodné a etanolové extrakty .....	21
4.3.2	Olejové extrakty .....	22
4.4	Analýza biomasy .....	22
4.4.1	Stanovenie celkových polyfenolov .....	22
4.4.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity s využitím ABTS .....	22
4.4.3	Stanovenie celkových flavonoidov .....	23
4.4.4	Stanovenie karotenoidov - HPLC/PDA .....	23
4.4.5	Analýza lipidov - Plynová chromatografia GC/FID .....	23
4.4.6	Príprava lipozómov .....	24
4.4.6.1	Enkapsulačná účinnosť .....	25
4.4.7	Veľkosť a stabilita častíc meraných pomocou ZetaSizer Nano ZS .....	25
4.4.8	MTT test cytotoxicity .....	25
4.5	Príprava krémov .....	25
4.5.1	Postup prípravy základnej emulzie o/v .....	25
4.5.2	Zloženie krémov a gélov .....	26
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	27
5.1	Optimalizácia kultivácie biomasy .....	27
5.2	Analýza obsahu karotenoidov - HPLC/PDA .....	27
5.3	Analýza lipidov - plynová chromatografia GC/FID .....	28
5.4	Charakterizácia extraktov .....	29
5.4.1	Stanovenie celkových polyfenolov .....	29
5.4.2	Stanovenie flavonoidov .....	30
5.4.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity s využitím ABTS .....	31
5.5	Lipozómové častice .....	32
5.5.1	Meranie veľkosti lipozómov pomocou DLS a stability pomocou ZP .....	33
5.6	Krémy a gély .....	36
5.7	MTT test - analýza cytotoxicity .....	37
6	ZÁVER .....	39
7	ZDROJE .....	40
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	43

## 1 ÚVOD

Nedávno sa zvýšil záujem o prírodné účinné látky ako alternatívy k syntetickým látkam. Hoci tieto zlúčeniny často vykazujú nižšiu aktivitu, sú netoxické [1]. To znamená, že existuje potreba vyvinúť nové a bezpečné produkty biologického pôvodu s vlastnosťami podobnými syntetickým. Tieto prírodné zlúčeniny sa nachádzajú v extraktoch rias.

Morské riasy produkujú obrovské spektrum sekundárnych metabolitov, biologicky aktívnych látok, pretože žijú v nepriaznivom prostredí, ale nie sú fotodynamicky poškodené, pretože syntetizujú ochranné zložky. Biomasa rias obsahuje veľa hodnotných látok: minerály, vitamíny (A, B, C, E), aminokyseliny, polysacharidy, polyfenolické zlúčeniny, terpény a lipidy. Mnohé z týchto bioaktívnych zložiek sa môžu extrahovať, aby sa dosiahli antioxidačné, protizápalové a antimikrobiálne účinky. Keďže dopyt po riasach prevyšuje v súčasnej dobe zásoby, viac než 90% rias získavame priemyselnou kultiváciou. V kozmetických prípravkoch z mikrorias sa začína používať najmä sinica *Arthrospira* a zelená riasa *Chlorella* [1], [2], [3].



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Riasy a mikroriasy

Riasy (Algae) a mikroriasy vďaka obsahu rôznych antioxidantov, antimikrobiálnych a protizápalových biologických látok menia kozmetický trh. Jedným takýmto bioaktívnym energetickým balíčkom je *Chlorella*. Je to sladkovodná mikroriasa s inherentne vyšším antioxidačným potenciálom [4]. Riasy predstavujú skupinu veľmi rôznorodných sladkovodných aj morských organizmov, do ktorých je zahrnutých 32 260 druhov. A ďalších 28 500 čaká na popis. Riasy majú nejednotnú stavbu bunky, obsah farbív a chlorofylov v plastidoch, čo dokazuje ich rôznorodosť. Zaraďujeme ich medzi prokaryotické aj eukaryotné organizmy. Riasy sú autotrofné, jednobunkové aj mnohobunkové nižšie rastliny [2], [5], [7]. Pri riasach pozorujeme veľkú rôznorodosť, ich veľkosť sa pohybuje od pikoplaktónu (0,2–2,0 µm v priemere) až po dĺžku 60 metrov. Veľké odlišnosti vidíme rovnako aj na úrovni bunkovej štruktúry, morfológie zásobných polysacharidov a pigmentov pre fotosyntézu [7].

### 2.2 Klasifikácia rias

Aktuálnejšie triedenie rias už rešpektuje jednotlivé vývojové vetvy. Oddelenia sú roztriedené podľa typu chlorofylov, pigmentov alebo prítomnosti pyrenoidu.

1. *Rhodophyta* (červené riasy)
2. *Heterokontophyta* (*Chromophyta*)
  - a. *Chrysophyceae* (žltohnedé riasy, *chrysomonády*)
  - b. *Xanthophyceae* (žltozelené riasy)
  - c. *Bacillariophyceae* (rozsievky)
  - d. *Phaeophyceae* (hnedé riasy, chlauhý)
  - e. *Raphidophyceae* (chloromonády)
3. *Haptophyta*
4. *Eustigmatophyta*
5. *Cryptophyta* (kryptomonády)
6. *Dinophyta* (panciernatky)
7. *Euglenophyta* (krásnoočká)
8. *Chlorophyta* (zelené riasy)
  - a. *Prasinophyceae*
  - b. *Chlorophyceae* (vlastné zelené riasy)
  - c. *Conjugatophyceae*
  - d. *Charophyceae* [5]

#### 2.2.1 *Chlorophyta* (zelené riasy)

Tu zaraďujeme jednobunkové organizmy (*Chlorella*) rovnako ako organizmy, ktoré tvoria kolónie (*Scenedesmus*), jednoduché vlákna (*Ulothrix*) alebo rozvetvené vlákna (*Cladophora*) či pletivové stielky (morský šalát *Ulvalactuca*) [7]. Zelené riasy oddelenia *Chlorophyta* majú väčšinou haploidný životný cyklus, kedy jedinou diploidnou bunkou je zygota. Meióza prebieha po klíčení zygoty. Nepohlavné rozmnožovanie zaisťuje jednobunkové a spravidla jednojaderné rozmnožovanie bunky [2].

Chloroplasty zachytávajú energiu slnečného svetla v molekulách chlorofylu a využívajú ju k výrobe energeticky bohatých molekúl sacharidov. Pri tomto procese sa uvoľňuje kyslík ako vedľajší produkt a rovnako ako mitochondrie obsahujú vlastnú DNA. Chloroplasty u rias tvoria skupinu biochemicky a funkčne odlišných fotosyntetických pigmentov a z nich najdôležitejší je chlorofyl. Ďalšou významnou zložkou fotosyntetických pigmentov sú karoteinoidy, čo sú červené, oranžové a žlté pigmenty. Rozdeľujeme ich do dvoch skupín. Prvou sú karotény a druhou xantofyly. Ich súčasťou sú antény, ktoré absorbujú žiarenie v rozsiahlejšej

škále ako chlorofyly. Týmto spôsobom je zabezpečený zvýšený prísun fotónov potrebných na fotosyntézu [2], [8].

Novou oblasťou záujmu sú veľkoobjemové kultúry mikrorias. Významné miesto v biotechnológií mikrorias má *Arthrospira* a *Chlorella* [2].

#### 2.2.1.1 *Chlorella*

Medzi najhodnotnejšie druhy považujeme *Chlorellu pyrenoidosa* a *vulgaris*. Prvýkrát bola objavená na konci 19. storočia pod mikroskopom holandského vedca Martinusa Beijernicka [9]. Je to jednobunková sladkovodná riasa. Ak má zabezpečené priaznivé podmienky akými sú čistá filtrovaná voda, slnečné žiarenie, množí sa až neuveriteľne rýchlo. *Chlorella* je naozaj veľmi bohatá na molekuly „mladosti“, čiže hlavne na antioxidanty. Obsahuje veľa B vitamínov ako napríklad B12 a tým zvyšuje odolnosť voči stresu [9], [10]. Esenciálne aminokyseliny, ktoré sa nachádzajú v tejto riasе, sú fenylalanín (2,8%), izoleucín (2,3%), leucín (4,7%), lyzín (3,1%), metionín (1,3%), treonín (2,4%), tryptofán (0,5%), valín (3,2%). Neesenciálne sú alanín (4,3%), arginín (3,3%), glycín (3,1%), prolín (2,5%), serín (2,0%) a iné [11].



Obrázok 1. *Chlorella saccharophila*

### 2.3 Sinice

Sinice (*Cyanobacteria*) sú prokaryotické organizmy, jednobunkové alebo vláknité. Numericky sú tieto organizmy najviac zastúpené v oceánskom ekosystéme. Pigmenty, ktoré nájdeme v cyanobaktériách sú chlorofyl, fykocyanín (modrý), fykoerytrín (červený), allofykocyanín (modrofialový) a karotenoidy. Niektoré sinice obsahujú aj plynové vezikuly, ktoré slúžia na reguláciu vztľaku a tylakoidy sú uložené voľne v cytoplazme. Reprodukcia prebieha nepohlavne, jednoduchým rozdelením buniek, fragmentáciou kolónie alebo vláknami. Zaujímavosťou je, že sú schopné fixovať dusík, ale nie v heterocykloch [2], [6].

#### 2.3.1 *Arthrospira (Spirulina)*

*Arthrospira (Spirulina)* je vláknitá sinica, ktorá sa zvykne nazývať aj modro–zelená riasa. Je to z dôvodu jej výrazného sfarbenia. Bunky v sebe majú veľké množstvo ribozómov, kde dochádza k syntéze bielkovín. Toto je tiež dôvod, prečo obsahuje tak vysoké množstvo proteínov. Zastúpenie aminokyselín je nasledujúce. Esenciálne aminokyseliny ako fenylalanín (3,98%), izoleucín (4,5%), leucín (5,8%), lyzín (4 %), metionín (2,2%), tryptofán (1,1%), valín (6 %). Neesenciálne alanín (5,8%), arginín (6%), cysteín (0,7%), glycín (3,5%), tyrozín (4,6%). Uvedený tyrozín napríklad spomaľuje starnutie buniek [2], [10].



Obrázok 2. *Arthrospira* (10. deň), fluorescenčný mikroskop, zväčšenie 100x

## 2.4 Princíp kultivácie mikrorias

Teoreticky by sa podmienky kultivácie mali v čo najväčšej miere podobať prirodzenému prostrediu rias. Kým v prirodzenom prostredí museli tieto organizmy čeliť nehostinným podmienkam, po izolácii od prirodzeného prostredia sú kmene udržiavané vo veľkej miere v umelých podmienkach s presnými zloženiami médií, množstva svetla a teploty [6], [12]. Pre striktné autotrofné riasy je pre rast potrebný len oxid uhličitý, voda, živiny a stopové prvky. Prostredníctvom fotosyntézy je riasa schopná syntetizovať všetky biochemické zlúčeniny potrebné na rast. Pri fototrofnej kultivácii mikrorias využívame dva druhy svetla – prirodzené (slnko) a umelé. Síce je slnečná energia zdarma, ale je závislá na dennom cykle, ročnom období a lokalite. Základom kultivácie je cirkulácia či miešanie kultúr, aby nedochádzalo k usadzovaniu. Bunky sú tak neustále vystavené svetlu a je zaistený dostatočný prísun živín (najmä dusík a fosfor). Ďalším dôvodom miešania je regulácia teploty (25–35 °C) a výmena CO<sub>2</sub> ako zdroj uhlíka a kyslíka vzniknutého fotosyntézou. Pri hustom pestovaní kultúr je kľúčovým bodom prísun oxidu uhličitého zo vzduchu (< 0,04 ppm), pretože jeho koncentrácia je o rád nižšia. Biologická kontaminácia kultúr čistých rias inými eukaryotickými a prokaryotickými organizmami vo väčšine prípadov znehodnocuje experimentálnu prácu a môže viesť k zániku požadovaných druhov rias [12].

### 2.4.1 Kultivácia biomasy

V praxi je veľmi ťažké získať čisté (axenické) kultúry. Ak sa v kultúre objavia biologické kontaminanty, najlepším liekom je izolovať jednu bunku z kultúry mikropipetou a pokúsiť sa vytvoriť novú čistú kultúru. V skutočnosti neexistuje žiadny spôsob ako dokázať, že kultúra mikroorganizmov je úplne axenická [6]. V praxi teda axenická zvyčajne znamená bez preukázateľných nežiaducich prokaryotických alebo eukaryotických organizmov.

#### 2.4.1.1 Teplota

Teplotu určíme tak, aby sa čo najviac podobala tej, pri ktorej boli organizmy izolované v ich prirodzenom prostredí. Najčastejšie volíme teplotu 18–20 °C. Teploty nižšie ako 16 °C spomaľujú rast, zatiaľ čo hodnoty vyššie ako 35 °C môžu mať letálne následky [12].

#### 2.4.1.2 Svetlo

Príliš vysoká intenzita svetla môže viesť k fotoinhibícii. Najčastejšie používané intenzity svetla zodpovedajú približne 5 až 10 % plného denného svetla. V praxi nastavujeme fotoperiodu na čas svetla/tmy [6], [13].

#### 2.4.1.3 Rozsah pH

Väčšinou pre riasy volíme optimálne pH v rozmedzí 7–9. Niektoré druhy naopak žijú v kyslom prostredí. *Arthrospira* sa pestuje v slaných alebo sladkých vodách s vysokou hodnotou pH (pH v rozmedzí 8 až 11). Pre iné organizmy môže byť táto hodnota pH smrteľná [14].

#### 2.4.1.4 Salinita

Bola zistená veľká tolerancia morských rias voči zmene salinity. Väčšina kmeňov rastie pri slanosti mierne nižšej než je ich prirodzené prostredie. Napríklad riasa *Dunaliella* je veľmi významná riasa z biotechnologického hľadiska, lebo sa pestuje pri 1–4M NaCl [6], [12].

#### 2.4.2 Otvorené kultivačné systémy

Môžu to byť prírodné alebo umelé nádrže, kde majú kultúry priamy kontakt s prostredím, v ktorom sa nachádzajú. Oproti uzavretým systémom sú jednoduchšie a nenáročnejšie na cenu a obsluhu. Miešanie je sprostredkované pomocou čerpadla s rotujúcimi ramenami, lopatkovými kolami alebo prebublávaním vzduchu. Sú pestované pri nízkej koncentrácii, 0,5 až 1g biomasy na liter, čomu odpovedá aj nízka produktivita. Túto voľbu kultivácie používame pre rýchlo rastúce mikroriasy ako sú *Arthrospira*, *Dunaliella*, *Chlorella* a *Nannochloropsis* alebo špecifické kmene (vysoká salinita média) [12].

#### 2.4.3 Uzavreté systémy – fotobioreaktory

Fotobioreaktory sú alternatívou na výrobu veľkého množstva mikrobiálnej biomasy. Termín „fotobioreaktor“ sa používa na označenie uzavretých systémov, ktoré neumožňujú priamu výmenu plynov alebo kontaminantov s atmosférou. Je možné lepšie kontrolovať parametre kultúry, ako sú pH, kyslík, koncentrácia oxidu uhličitého a teplota. Dva z najväčších komerčných systémov, ktoré sú v súčasnosti v prevádzke, predstavuje závod v Klötze v Nemecku na výrobu biomasy *Chlorella* a závod Algatechnologies v Izraeli na výrobu biomasy *Haematococcus* [6].

### 2.5 Využitie metabolitov rias a siníc v kozmetike

Kozmetický priemysel využíva veľké množstvo mikroskopických rias. Aminokyseliny a nukleové kyseliny hydratujú pokožku, vitamín E a karotenoidy pôsobia ako antioxidanty. Takisto lipidy sa využívajú v anti-aging kozmetike a podporujú regeneráciu tkaniva [12].

#### 2.5.1 Fotosyntetické pigmenty rias a mikrorias

Chlorofyl *a* považujeme za najdôležitejší fotosyntetický pigment všetkých rias. V prevažnej väčšine rias je chlorofyl *a* jediným pigmentom v tylakoidoch. V ostatných skupinách nájdeme chlorofyly dva, veľmi vzácne aj tri. Napríklad panciernatky alebo obrnenky majú chlorofyly *a*, chlorofyl *c* [2]. Karotenoidy zaraďujeme medzi prekursor vitamínu A. Dokážu eliminovať vplyv voľných radikálov a toďaka svojim silným antioxidačným účinkom. Ďalej čiastočne absorbujú v UV oblasti žiarenia a chránia našu pokožku pred škodlivými účinkami UV žiarenia. Všetky karotenoidy slúžia ako bežné a zdraviu bezpečné farbivá v kozmetickom priemysle. Medzi najdôležitejšie karotenoidné pigmenty zaraďujeme  $\beta$ -karotén, astaxantín a luteín [15].

##### 2.5.1.1 Chlorofyl

Jeho výskyt zaznamenávame v štyroch formách. Označujeme ich ako chlorofyl *a, b, c, d*. Tieto chlorofyly sú zelené pigmenty uložené v tylakoidoch. Chlorofyl, ktorý nájdeme u rias rozlišujeme na dva typy A (zelemodrý) a B (žltozelený). Molekula chlorofylu obsahuje porfyrinový kruh s centrálnou umiestnenou atómom horčíku. Obsah chlorofylu je vyšší ako nájdeme napríklad v zelených listoch *Lucerny*, okolo 5%, a rovnako aj jeho získanie je jednoduchšie, pretože riasy neobsahujú pletivá a iné orgány prítomné u vyšších rastlín. Mednaté deriváty chlorofylu nazývame chlorofyliny. Dnes sa používajú ako zelené farbivo v kozmetickom priemysle, kde ich význam vo forme prírodného aditíva stále rastie. V tejto oblasti sa otvárajú veľké možnosti pre produkciu prírodného chlorofylu *a/b* izolovaného z mikrorias, pretože ho obsahujú dvakrát viac v porovnaní s vyššími rastlinami [2], [15], [16], [17].

### 2.5.1.2 $\beta$ -karotén

Chemická štruktúra  $\beta$ -karoténu mikrorias je zložená najmä z all-trans a 9-cis izomérov. Ide o polyenový tetraterpén s 40 atómami uhlíka. Najviac je zastúpený v mikroriase *Dunaliella*, ktorá akumuluje až 12 %  $\beta$ -karoténu [15].

### 2.5.1.3 Luteín

Používa sa v potravinárskom priemysle ako farbivo pre kŕmne doplnkové látky a prevenciu rakoviny [18]. Chemickú štruktúru luteínu tvorí polyenový reťazec, ktorý je zhodný s  $\beta$ -karoténom, a dve hydroxylové skupiny na koncových cykloch. Medzi zástupcov zaradujeme rod *Chlorella*, *Scenedesmus* alebo *Muriellopsis* [15].

## 2.5.2 Lipidy

Produktivita lipidov pri mikroriasach je niekoľkonásobne väčšia ako pri rastlinných olejoch. Túto skupinu tvoria fosfolipidy, glykolipidy, nasýtené a nenasýtené mastné kyseliny. Skupina rias *Dunaliella*, *Chlorella* a *Arthrospira* je z hľadiska vysokej koncentrácie lipidov najvýznamnejšia [18]. Mikroriasy dokážu akumulovať veľké množstvo lipidov, čo sa využíva na výrobu bionafty pomocou transesterifikácie [19].

## 2.5.3 Vitamíny

Cez ľudskú kožu penetrujú iba lipofilné vitamíny, kým vitamíny rozpustné vo vode majú túto transdermálnu cestu uzavretú. Morské mikroriasy môžu byť využívané na pokrytie potrieb vitamínu A, C, B2, B12 a B16 [20]. Vitamín C používame ako antioxidant pre vodnú fázu a zároveň slúži ako vychytávač voľných radikálov [22].

### 2.5.3.1 Vitamín E

Vitamín E sa považuje za účinný antioxidant. Antioxidačný mechanizmus tokoferolov je čiastočne spôsobený hydroxylovou skupinou v chromanolovom kruhu poskytujúci atóm vodíka, aby sa znížili voľné radikály [21].

### 2.5.3.2 Vitamín B2

Riboflavin (vitamín B2) je veľmi dôležitý pre flavonoidové enzýmy. Podporuje stálu regeneráciu epidermis a normálny vývoj vlasových folikulov [22].

### 2.5.3.3 Vitamín B5

Jeho výhodou je, že sa ho nemôžeme predávkovať. Využitie nájde v prípravkoch na opaľovanie alebo tiež ako pleťová voda či denné krémy a rúže.

## 2.5.4 Polysacharidy

Vďaka dispergačným účinkom a vysokému hydratačnému potenciálu nájdeme ich využitie v kozmetickom priemysle. Beta-1,3-glukány sú druhou najdôležitejšou látkou obsiahnutou v zelenej riase *Chlorella*, ktorá stimuluje cytokíny a zastavuje rast rakovinových buniek in vivo [15]. Sulfátové polysacharidy v stenách mikrorias vykazujú antioxidačnú aktivitu a ďalej ich farmaceuticky priemysel používa ako protizápalové a antivírusové látky [18].

## 2.5.5 Proteíny

Proteíny obsiahnuté v mikroriasach majú veľký potenciál byť alternatívnym zdrojom bielkovín, pretože obsahujú všetky základné aminokyseliny [23]. Svoj význam majú ako hydratačné činidlá vo vlasovej kozmetike. Okrem základnej nutričnej hodnoty tieto proteíny priťahujú pozornosť pre schopnosť tvorby gélov, peny a pre antikoagulačné, antimikrobiálne, antioxidačné vlastnosti. Niektoré sa môžu viazať na receptory na povrchu buniek a zvyšovať tým vstrebateľnosť vápniku. Tieto štepy sa používajú pri liečbe osteoporózy a Pagetovej choroby, ale využitie našli aj v kozmetike [22], [23].

## 2.6 Plet'ová omladzujúca kozmetika

Mikroriasy vďaka obsahu rôznych antioxidantov, antimikrobiálnych a protizápalových biologických látok menia kozmetický trh. Súčasná situácia vykazuje stále vyšší dopyt po omladzujúcej „anti-aging“ kozmetike. Starnutie pokožky je spojené so zníženým počtom Langerhansových buniek a T<sub>1</sub>-lymfocytov, perivaskulárnych mastocytov a zmenšením kapacity cievnych pletení v papilách koria [24]. Karotenoidy sú hlavnými aktívnymi zložkami medzi zložkami s „anti-aging“ alebo omladzujúcimi vlastnosťami.  $\beta$ -karotén prevyšuje túto rodinu pigmentov a má vynikajúcu schopnosť zabrániť tvorbe reaktívnych foriem kyslíka. *Dunaliella salina* je schopná produkovať viac ako 10%  $\beta$ -karoténu a používa sa preto vo viacerých kozmetických prípravkoch [4], [22], [24].

### 2.6.1 Pomocné látky

Pre neutralizáciu prirodzených pachov základných surovín a účinných látok sa používa nevýrazná parfumácia. V záujme zachovania mikrobiálnej čistoty je v priebehu celej doby použiteľnosti (1–3 roky) veľmi dôležité, a to najmä pre produkty s vodnou fázou, inkorporovať látky s antimikrobiálnym a teda konzervačným účinkom. Pre zachovanie stability produktov lipidovej povahy a na odstránenie nežiaducej oxidácie sa používajú antioxidanty ako  $\beta$ -karotén,  $\alpha$ -tokoferol a vitamín C. Pri výrobe emulzných masť a krémov sa pre lepšiu miešateľnosť jednotlivých zložiek a následnú roztierateľnosť a vstrebateľnosť pridávajú emulgátory [22].

## 2.7 Lipozómy v kozmetike

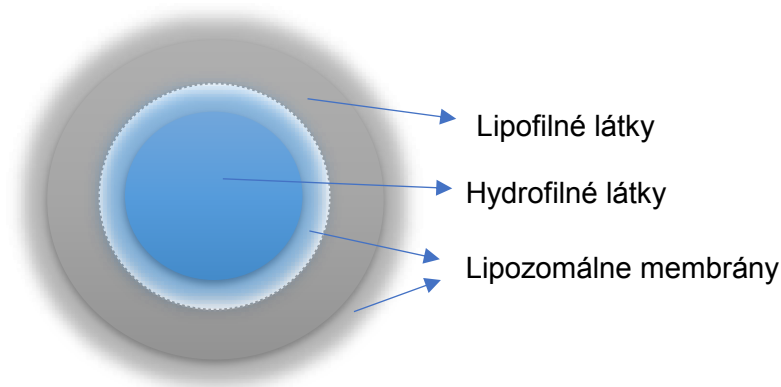
S príchodom nanotechnológií sa lipozómy prvýkrát pripravili v 50. rokoch minulého storočia [20]. Lipozómy sú duté guľovité útvary, ktoré sú na povrchu ohraničené dvojlamelárnou membránou. Lipoidné štruktúry s dvoma vrstvami odpovedajú princípu biologických membrán. Veľkosť lipozómov je v rozmedzí 30 až 1000 nm [25]. Sú to mikroskopické agregáty molekúl lipidov, ktoré sú dispergované v hydrofilnom rozpúšťadle. V kozmetike sa zameriava vývoj na lipozomálne emulzie obsahujúce biologicky účinné látky, a to živočíšnej aj rastlinnej povahy ako napríklad kyselina hyaluronová, vitamíny a ochranné UV faktory. Pri kontakte epidermis sa rozpadajú a uvoľňujú účinné látky po preniknutí do povrchových štruktúr epidermis účinné látky, ktoré ďalej prestupujú do ciev. Novú aplikačnú formu, ktorá je ale obdobnou lipozómom, predstavila na trh firma L'Oréal. Patent predstavuje oleozómy, čo sú olejové mikrovapôčky, v ktorých procesom homogenizácie sú pod vysokým tlakom uzavreté lipoidné látky. Tieto emulzné systémy alebo aj „balms“ (balzamy) sa líšia od lipozómov tým, že ich obalové štruktúry neobsahujú žiadne povrchovo aktívne látky [24], [25].

### 2.7.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy majú časť molekuly polárnu („hydrofilná hlavička“) a druhú časť nepolárnu („hydrofóbny chvost“). Typickým príkladom je štruktúra 1,2-diacyl-fosfatidylcholinu alebo tiež lecitínu. S rastúcou dĺžkou reťazca nepolárnej časti, mastných kyselín, prudko klesá aj kritická micelárna koncentrácia (CMC). Samovoľná organizácia fosfolipidov do štruktúry lipozómov prebieha len pri teplote vyššej ako je teplota fázového prechodu  $T_m$  [24], [25].

### 2.7.2 Príprava lipozómov

Z dôvodu lepšej priepustnosti a pevnosti lipozómov sa pripravujú zo zmesi fosfolipidov a cholesterolu. Pomer je závislý na enkapsulačnej účinnosti požadovaných častíc ale obvykle sú to fosfolipidy a cholesterol v pomere 3:1 až 1:1. Hydrofilné zlúčeniny sa enkapsulujú do vodnej časti štruktúry lipozómu a hydrofóbne molekuly sa zabudujú do štruktúry lipidovej dvojvrstvy. Rozoznávame prípravu pomocou sonifikácie, hydratácie fosfolipidového filmu, dehydratáciou alebo injekčným vstrekaním [25].



Obrázok 3. Lokalizácia účinných látok v lipozómoch

### 2.7.3 Metóda DLS

Dynamic light scattering (DLS) alebo tiež dynamický rozptyl svetla je metóda, ktorá slúži k stanoveniu veľkosti častíc v disperzných sústavách. Zdrojom rozptýleného svetla sú častice, ktoré sa pohybujú na princípe Brownovho pohybu. Malé častice sa pohybujú rýchlejšie ako veľké.

#### 2.7.3.1 Stanovenie zeta potenciálu

Zeta potenciál sa počíta z rýchlosti pohybu častíc v elektrickom poli. Ak je hodnota zeta potenciálu v rozmedzí 25 až 25 mV, tak táto sústava nie je stabilná, pretože častice nemajú dostatočne veľký náboj, aby sa odpudzovali. Ak sa zeta potenciál blíži k nule, môže dôjsť ku zhlukovaniu častíc, pretože príťažlivé sily prevládajú nad odpudivými [25], [26], [27].

### 2.7.4 Enkapsulácia aktívnych látok

Je to proces, kedy uzavrieme látku (bioaktívna zložka) dovnútra inej látky, kde je chránená pred fyzikálnou bariérou, a ktorá uvoľňuje svoj obsah v špecifických podmienkach. Častice majú väčšinou priemer od niekoľkých nm do niekoľko mm. Jeden z najdôležitejších dôvodov enkapsulácie je vytvorenie zvýšenej stability [25], [26].

### 2.7.5 MTT test - analýza cytotoxicity

Test MTT sa často používa na meranie proliferácie buniek a na skríning protirakovinových liečiv. Žltú tetrazolínovú soľ MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid) živé bunky redukujú na nerozpustný fialový produkt. MTT je vo vode rozpustná a na fialový formazan sa premieňa rozštípením tetrazolínového kruhu vnútri mitochondrií. Výsledky vyhodnocujeme pomocou ELISA metódy (spektrofotometer) a vykazujú vysoký stupeň presnosti [28], [29].

## 2.8 Kozmetický základ (vehikulum)

Najpoužívanejšie základy pre výrobu dermatologických výrobkov sú masťovej povahy. Podľa miešateľnosti s vodou ich delíme na hydrofilné, ktoré sa s vodou miešajú v rôznom pomere, a hydrofóbne, ktoré sa miešajú s vodou obmedzene alebo vôbec [24].

### 2.8.1 Emulzie

Väčšina emulzií sa skladá z vodnej fázy, kde sa rozpustia hydrofilné látky a z olejovej fázy, v ktorej sa rozpustia "masťové" alebo hydrofóbne látky. Následne je jedna kvapalina alebo fáza jemne rozptýlená v druhej. Okrem toho obsahujú aj emulgátory, ktoré zabezpečia to, aby sa fázy neoddelili, a teda znižujú povrchové napätie medzi oboma fázami. Môžu obsahovať aj stabilizátory, ktoré zvýšia viskozitu, a tak zabraňujú oddeľovaniu fáz [30].

## **2.9 Metódy analýzy biomasy a metabolitov**

K stanoveniu biomasy a látok vyprodukovaných riasami sa najčastejšie používa separačná technika HPLC (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia) alebo GC (plynová chromatografia).

### **2.9.1 Extrakcia**

Pomocou extrakcie separujeme látky na princípe prechodu medzi dve nemiešateľné fázy. Najčastejšie je to extrakcia medzi pevnou a kvapalnou alebo dvoma kvapalnými fázami. Sledované látky majú nepolárnu povahu. Princípom extrakcie v kvapalinách je podmienka nerozpustnosti alebo čo najmenšej rozpustnosti pôvodného rozpúšťadla v extrahovadle [31].

### **2.9.2 Transesterifikácia**

Pri tejto reakcii dochádza k výmene uhľovodíkových reťazcov medzi alkoholom a esterom mastnej kyseliny. Často túto reakciu katalyzujeme pridaním bázy alebo kyseliny. Túto reakciu vieme uskutočniť aj pomocou katalýzy lipázy [32], [33].

### **2.9.3 Absorpčná spektrometria (spektrofotometria)**

Množstvo absorbovaného žiarenia závisí od celkového počtu absorbujúcich častíc, ktoré interagujú s lúčom. V atómovej ako aj molekulovej spektroskopii sa absorbancia meria v maxime vhodného absorpčného pásu vo viditeľnej, ultrafialovej oblasti. Absorpčné maximum zabezpečí čo najpresnejšie výsledky merania. Po priechode je časť žiarenia absorbovaná vzorkom a následne dôjde k excitácii valenčných elektrónov a teda ku emisii žiarenia [31], [34]. Pre spektrofotometrické stanovenie sa používa najčastejšie wolfrámová (350–3000 nm), halogénová alebo deutériová (160–375 nm) lampa. Ako detektor sa používa sklenená banička s dvoma elektródami (fotonka). Ďalším detektorom je fotonásobič. Dopadom fotónu na svetlocitlivú vrstvu dôjde k vyrazeniu elektrónu, ktorý je urýchlený v elektrickom poli a pritiažený k dynóde [33].

### **2.9.4 Chromatografia**

Chromatografia je metóda, ktorá využíva delenie medzi dve fázy. Jedna z nich je pohyblivá (kvapalina alebo plyn) a druhá je nepohyblivá, ktorá nadobúda najrôznejšie formy. Princíp delenia spočíva v odlišnej interakcii jednotlivých zložiek vzorky so stacionárnou a mobilnou fázou. Kolónou naplnenou stacionárnou fázou postupuje určitou rýchlosťou mobilná fáza. Pri plynovej chromatografii je mobilnou fázou plyn a pri kvapalinovej kvapalná látka. Mobilná fáza unáša našu vzorku na koniec kolóny, pričom jedna zložka ide pomalšie ako druhá. Čím väčšia interakcia, tým má zložka väčší retenčný čas. Na chromatograme rozlišujeme odozvu detektoru, ktorá je funkciou koncentrácie eluovanej zložky na osi y a dĺžku jednotky (mm) na osi x. Kvalitatívna informácia neznámej látky je poloha píku na osi x. Kvantitatívna charakteristika sa získa z plochy píku a u symetrických zón z výšky píku [25], [34].

#### **2.9.4.1 Kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou – HPLC/MS**

Mobilná fáza je kvapalina. Vďaka kvapalinovej chromatografii dnes delíme obrovské množstvo organických zlúčenín. Najrozšírenejšie detektory sú fotometrické, fluorescenčné alebo zapájame hmotnostný spektrometer. Hmotnostná spektrometria je inštrumentálna analytická metóda, vďaka ktorej určíme hmotnosti atómov, molekúl a molekulových fragmentov. Prielom v riešení spojenia HPLC/MS nastal po objavení spôsobu ionizácie látok za atmosférického tlaku. Štandardne používané ionizácie sú elektrosprej (ESI), chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI) [25].

#### **2.9.4.2 Analýza lipofilných pigmentov metódou RP/HPLC**

Umožňuje súbežne identifikovať aj kvantifikovať väčšinu aktívnych látok, ak máme k dispozícii štandardy. Karotenoidy sú farebné látky, a teda absorbujú vo viditeľnej oblasti. To je dôvod,



prečo môžeme využiť UV/VIS detekciu pri  $\lambda = 420\text{--}480\text{ nm}$ . Ako stacionárna fáza sa používa reverzná fáza C18, mobilná fáza je zložená obvykle z metanolu/acetónitrilu a vody [25].

#### **2.9.5 Plynová chromatografia GC**

Zložky sú separované v plynnej fáze. GC je vhodná najmä pre organické látky s teplotou varu približne  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Podmienkou je, aby analyzovaná vzorka bola vyparená definovaným spôsobom. Pre vyparovanie zložky z roztoku platí Raoultov zákon. Podľa stacionárnej fázy rozlišujeme plynovú adsorpčnú a plynovú rozdeľovaciu chromatografiu. Detektory, ktoré sa uplatňujú v tejto technike, je plameňový ionizačný detektor (FID) a detektor elektrónového záchytu (ECD). Zdroj žiarenia je mäkké rádioaktívne žiarenie izotopu  $^{63}\text{Ni}$  [34].

### **3 CIELE PRÁCE**

V rámci tejto bakalárskej práce budú riešené nasledujúce úlohy:

- 1) Kultivácia zvolených kmeňov rias a izolácia vybraných aktívnych látok
- 2) Porovnanie obsahu aktívnych látok u zvolených producentov na trhu dostupných rias
- 3) Návrh na testovanie kozmetického výrobku s obsahom aktívnych látok z rias vo voľnej aj enkapsulovanej forme

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité chemikálie, prístroje a materiál

#### 4.1.1 Chemikálie použité pre kultiváciu rias a siníc

Chlorid mangánatý tetrahydrát p.a., Lachema (CZE)  
Chlorid sodný p.a., Penta (CZE)  
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (CZE)  
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema (CZE)  
Hydroxid draselný, Lach-ner, S.r.o. (CZE)  
Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Dusičnan kobaltnatýhexahydrát p.a., Penta (CZE)  
Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Kyselina bóritá p.a., Lachema (CZE)  
Kyselina sírová 96%, Lach-ner, S.r.o. (CZE)  
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta (CZE)  
Síran draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Síran horečnatýheptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Síran meďnatý pentahydrát, Penta (CZE)  
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Síran zinočnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Uhličitan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (CZE)  
Vitamín B12, Sigma-Aldrich (DEU)

#### 4.1.2 Chemikálie použité pre tvorbu a analýzu vodných a etanolových extraktov, olejov a lipozómov

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuricacid) diammoniumsalt), Sigma-Aldrich (DEU)  
Cholesterol, Sigma-Aldrich (DEU)  
Chloroform pro HPLC, Roth (DEU)  
Hydroxid sodný, Lach-ner, S.r.o. (CZE)  
Ethanol p.a., Lach-ner (CZE) Ethanol pro HPLC, Sigma- Aldrich (DEU)  
Kyselina chlorovodíková (36 %), Lach-ner, S.r.o. (CZE)  
L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, Sigma-Aldrich (DEU)  
Trolox, Sigma-Aldrich (DEU)  
Uhličitan sodný, Lachema (CZE)

#### 4.1.3 Prístroje a pomôcky použité pre analýzu extraktov a lipozómov

Analytické váhy, Boeco (DE)  
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
Gerhardt Soxtherm, SOX 412  
Spektrofotometr VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (GB)  
Trepáčka Yellowline, (SRN)  
Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor Sonopuls, Bandelin (DEU)  
Vakuová rotačná odparka RV 06 ML, IKA (DEU)  
ZetaSizer Nano ZS, Malvern (GBR)

## 4.2 Kultivácia mikroorganizmov

### 4.2.1 Vytvorenie zásobnej kultúry

Laboratórne sklo a iné pomôcky, ktoré mohli kontaminovať kultúry boli vysvietené UV svetlom, prišli do kontaktu s 96 % etanolom alebo ohňom. Čisté kultúry rias a siníc boli zaočkované na agar krížovým rozterom v petriho miskách. Pre očkovanie v sterilnom boxe boli použité jednorazové sterilné klíčky. Kontaminácia baktériami bola sledovaná pod mikroskopom pri 100x zväčšení.

### 4.2.2 Kultivácia rias a siníc

Mikroriasy *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila* a sinica *Arthrospira maxima* boli ako čisté kultúry získané zo zbierky autotrofných organizmov (CCALA) z botanického ústavu AV ČR v Třeboni. Kultúry boli prečistené antibiotikami a krížovým rozterom. Pre kultiváciu sme zvolili tekuté BBM a Spirulina médium. Chemikálie použité pre produkčné médium sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 1, Tabuľka 2).

Tabuľka 1. Zloženie kultivačného BBM média pre riasy

Chemikália	[g/l dH <sub>2</sub> O]
NaNO <sub>3</sub>	25,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,50
EDTA	50,00
NaCl	2,50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,98
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44
MoO <sub>3</sub>	0,71
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49
KOH	31,00
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96%	1 ml

Tabuľka 2. Zloženie kultivačného Spirulina média pre sinice

<i>Spirulina 1</i>	
Zložka	[g/500ml dH <sub>2</sub> O]
NaHCO <sub>3</sub>	13,61
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
<i>Spirulina 2</i>	
Zložka	[g/500ml dH <sub>2</sub> O]
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,04

	[ml/500ml dH <sub>2</sub> O]
P-IV Metal Solution	6
Chu Micronutrient Solution	1
Vitamín B12	1

Riasové média boli sterilizované v autokláve. Do tohto produkčného média sa sterilne zaočkova kultúra rias tak, aby sa optická hustota vzniknutého roztoku blížila hodnote  $A=0,1$ . Riasy boli kultivované v dvoch dvojlitrových kvapalných médiách pri laboratórnej teplote. Nepretržite boli osvetlené a prevzdušňované, aby bol zabezpečený dostatočný prísun uhlíka. Kultivácia prebiehala do nárastu biomasy. Ďalej bola vypestovaná kultúra centrifugovaná pri otáčkach 6000–11000 počas 5 minút. Supernatant sa uchoval v centrifugačných skúmavkách v mraziacom zariadení. Potom sa vzorky na 24 hodín uložili do lyofilizačného zariadenia, kde sa kultúra mrazom vysušila.



Obrázok 4. *Chlorella vulgaris* po zaočkovaní

#### 4.2.3 Rastové krivky

Po zaočkovaní kultúry do požadovaného väčšieho objemu bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 680 nm oproti destilovanej vode ako blanku. Vzorky sme odoberali počas 17 dní. *Chlorella vulgaris* bola riasa, ktorej sa darilo najviac. Jeden z dôvodov mohol byť ten, že bola prevzdušňovaná intenzívnejšie.

### 4.3 Príprava extraktov

#### 4.3.1 Vodné a etanolové extrakty

Po optimalizácii extrakcie do rôznej koncentrácie etanolu z hľadiska množstva detegovaných polyfenolov boli ako najvhodnejšie zvolené vodné extrakty a extrakty do 20 % etanolu. Extrakty boli 0,5 a 24 hodinové o  $c = 1\text{g}/10\text{ml}$ .



Obrázok 5. Lyofilizovaná biomasa a komerčná riasa

#### 4.3.2 Olejové extrakty

Na analytických váhach bolo do extrakčnej patróny navážených 10 g komerčnej riasy, alebo dostupné množstvo vypestovanej biomasy. Následne bola extrakčná patróna utesnená vatou, doplnená rozpúšťadlom (hexán) a vložená do extraktoru Soxtherm. Pripravené extrakty boli zakonzentrované na vákuovej odparke a umiestnené na 24 hodín do exsikátoru pre dokonalé odparenie rozpúšťadla. Následne boli vyizolované olejové extrakty zvážené a uchované pre ďalšie stanovenie.

Tabuľka 3. Parametre pre extraktor Soxtherm

Celková doba extrakcie:	3 hod 4 min
Extrakcia horúcim rozpúšťadlom:	1 hod 30 min
Teplota:	170 °C
Rozpúšťadlo:	hexán



Obrázok 6. Zľava *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*

#### 4.4 Analýza biomasy

##### 4.4.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Na stanovenie obsahu celkových polyfenolov v riasach sa používa metóda s Folin–Ciocalteuovým činidlom, ktoré je zriedené v pomere 1:9. Do skúmavky sa napipetuje 1 ml činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 µl vodného extraktu z riasy. Po 5 minútach sa pridá 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu vápenatého. Po 15 minútach sa zmeria absorbancia pri  $\lambda = 750$  nm. Obsah celkových polyfenolov sa v neznámej vzorke vypočíta po dosadení do kalibračnej rovnice kyseliny gallovej (0,1 až 0,5 mg/ml) [25].

##### 4.4.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity s využitím ABTS

Metóda je založená na princípe hodnotenia zhášania katiónu radikálu ABTS našou vzorkou. Nájdeme ju aj pod označením metóda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), pretože tu porovnávame antiradikálovú aktivitu vzorky s antiradikálovou aktivitou Troloxu (vitamín E). Kalibračná krivka Troloxu je v rozmedzí koncentrácie 50 až 400 µl/ml. Pred použitím sa radikál zriedi etanolom pre UV/VIS na absorbanciu 0,7 a meriame pokles absorbancie pri  $\lambda = 734$  nm [25]. Pri stanovení antioxidačnej aktivity krému sa naváži 10 mg produktu a rozpustí v 1 ml etanole. Následne odoberáme 10 µl na analýzu. Pri géli rovno vážime 10 mg a pridávame zriedený roztok radikálu.

#### 4.4.3 Stanovenie celkových flavonoidov

Do skúmavky sa napipetuje 0,5 ml extraktu vzorku, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5 % roztoku dusičnanu sodného. Roztok je premiešaný a po 5 minútach sa pridá 0,2 ml 10 % roztoku chloridu hlinitého a opäť sa premieša. Po 5 minútach sa pridá 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Po 15 minútach sa meria absorbancia pri 510 nm.

#### 4.4.4 Stanovenie karotenoidov – HPLC/PDA

Do šróbovacej mikroskúmavky Eppendorf sa navážilo 15 až 20 mg lyofilizovanej biomasy. Ďalej sa pridalo minimálne 100 µl destilovanej vody. Na 10 minút sme ju vložili do mraziacieho zariadenia aby sa porušili bunkové štruktúry. Potom sme pridali sklenené guľičky v acetóne v dvojnásobnom množstve ku stanovovanej biomase a na 20 minút umiestnili na mixér vortex. Zmes sme niekoľkokrát premyli acetónom v 4 ml vialke, až kým sa neodfarbila vrstva buniek. Potom bol extrakt odparený a rozpustený v etanole chromatografickej kvality. Biomasu sme filtrovali cez 20 µm filter a previedli do čistej HPLC vialky. Ku chromatografickej analýze bola použitá zostava Thermo Fischer Scientific pomocou PDA detektora diódové pole. Bol zvolený mód gradientové elúcie na 25 minút. Dáta sa spracovali pomocou softwaru Xcalibur.

Tabuľka 4. Parametre pre Thermo Fischer Scientific

Kolóna:	C18 náplňová KinetexCore Shell
Rozmery kolóny:	4,6 mm x 150 mm
Rozmery častíc:	5 µm
Mobilná fáza A:	acetonitril:methanol:trisHCl 84:2:14
Mobilná fáza B:	methanol:ethylacetát 60:40
Prietok:	1 ml/min

#### 4.4.5 Analýza lipidov - Plynová chromatografia GC/FID

Do krymplovacej vialky sa navážilo 8 až 18 mg lyofilizovanej biomasy a k nej sa pridalo 1,8 ml transesterifikačnej zmesi. Takto pripravené skúmavky sa inkubujú v termo bloku počas 2 hodín pri 85 °C. Do 4 ml vialiek sa napipetuje 0,5 ml 0,05M NaOH, celý obsah transesterifikačnej skúmavky a 1 ml hexánu. Zmes intenzívne trepeme 15 minút na multipozičnom vortexe. Z hornej hexánovej fázy sme odpipetovali 0,1 ml do čistej GC vialky s 0,9 ml čistého hexánu. Analýza pobiehala na plynovom chromatografe Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph s autosamplerom. Detekcia prebehla vďaka plameňovému ionizačnému detektoru (FID).

Tabuľka 5. Parametre pre Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph

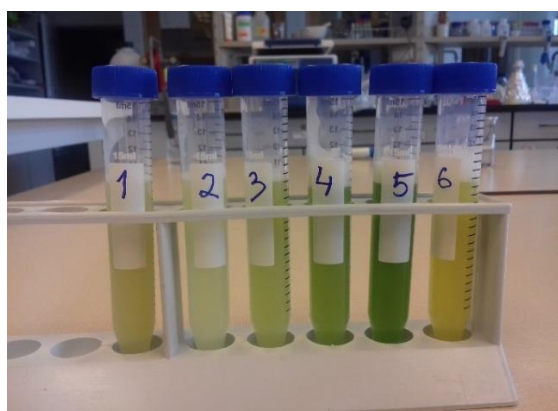
Kolóna:	Zebron ZB-FAME
Rozmery kolóny:	30 m x 0,25 mm x 0,2 µm
Rozpúšťadlo:	hexán
FID detektor:	260 °C
Prietoky:	350 ml/min vzduchu, 35 ml/min vodíka a 30 ml/min dusíka



Obrázok 7. Zľava – krymplovacie vialky inkubované v termobloku; oddelenie fáz po vortexe

#### 4.4.6 Príprava lipozómov

Boli pripravené lipozómy z olejových, vodných a etanolových (20%) extraktov. Do 25 ml kadičky sa navážilo 10 mg cholesterolu, 90 mg lecitínu a napipetovalo 1 ml extraktu + 9 ml vody. Olejový extrakt bol rozpustený v 1 ml chloroformu, ktorý sa po sonifikácii na magnetickej miešačke odparil. Príprava lipozómov prebiehala prostredníctvom ultrazvukového tyčového homogenizátoru Bandelin SONOPULS s intenzitou 95 %, energiou 16 580 kJ (program 5) počas jednej minúty (4 x 15 sekúnd).



Obrázok 8. Lipozómy zľava: Komerčná *Chlorella*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila* 0%, Komerčná *Chlorella*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila* 20%



#### 4.4.6.1 Enkapsulačná účinnosť

Z pripravených lipozómov sa odobral 1 ml do skúmavky eppendorf a centrifugoval sa 1 hodinu pri 11 000 ot/min. V supernatante sme spektrofotometricky stanovili celkové polyfenoly. Koncentrácia aktívnych látok v lipozómoch (enkapsulačná účinnosť) sa získala odčítaním koncentrácie celkových polyfenolov v supernatante od celkovej koncentrácie polyfenolov vo vzorke pred enkapsuláciou.



Obrázok 9. Olejové extrakty pred enkapsuláciou

#### 4.4.7 Veľkosť a stabilita častíc meraných pomocou ZetaSizerNano ZS

Liposomové častice boli po centrifugácii resuspendované v destilovanej vode a zriedené 100x. Najprv bola premeraná veľkosť nanočastíc a index polydisperzity. Následne bol premeraný zeta potenciál. Merali sme každú vzorku trikrát.

#### 4.4.8 MTT text cytotoxicity

Olejové lipozómy boli po centrifugácii a odliatí supernatanu podrobené MTT testu. Bunky sa zriedili médiom na koncentráciu  $2 \cdot 10^4$  buniek/100  $\mu$ l. Suspenzia sa pipetovala po 100  $\mu$ l na 96 jamkovú doštičku a na 24 hodín bola doštička v inkubátore. Z jamiek sa odpipetovalo 100  $\mu$ l vzorky do každej jamky. Doštička bola znovu na 24 hodín v inkubátore. Potom sa do každej jamky napipetovalo 20  $\mu$ l MTT o koncentracii 2,5 mg/ml v PBS. Bunky boli znovu v inkubátore počas 3 hodín. Na záver sa do každej jamky pridalo 100  $\mu$ l SDS v PBS a doštička bola uskladnená v tme. Po 24 hodinách sa odmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm.

### 4.5 Príprava krémov

#### 4.5.1 Postup prípravy základnej emulzie o/v

Pre vodnú fázu bolo napipetovaných 84 ml destilovanej vody, 3 ml glycerolu (86,5%), 0,5 ml konzervantu garmabenu II. Celá zmes sa vo vodnom kúpele zahrievala na teplotu 75 až 80 °C. Na prípravu olejovej fáze bolo do kadičky naváženených 2,5 g Ercawax BMI, 3 g cetylalkoholu, 1,5 g bielej vazelíny, 4 ml viskózneho parafínového oleja a 1,5 ml dimethikonu. Zmes sme opäť zahrievali na rovnakú teplotu. Keď mali obidve fázy 75 °C, vodná fáza sa umiestnila pod vysokorýchlostné miešadlo. Postupne bola do nej primiešaná homogénna olejová fáza a táto emulzia sa miešala 2 hodiny, kým teplota neklesla na 20 °C.

#### 4.5.2 Zloženie krémov a gélov

Lyofilizovaná biomasa, extrakty a lipozómy sa z dôvodu možnej degradácie teplom pridávajú až po určitom ochladení emulzie. Treba dbať na to, aby sa jednotlivé fázy nerozdelili a pridávať zložky pomaly. Ako najvhodnejšia metóda po dvoch neúspešných pokusoch sa určila tá, kde sa lipozómy pridali tesne pred vmiešaním olejovej fázy do vodného roztoku. Aby bola emulzia stabilná, pridal sa nižší objem destilovanej vody, a to 38 ml namiesto 42 ml, aby po pridaní extraktu a lipozómov bol zachovaný celkový objem vodnej fázy.



Obrázok 10. Zľava krém 4, krém 3

Po vytvorení koncentračnej rady pomocou gélovej bázy Carbomer 980 SuperGel™ CE (karbomér – aniónový polymér kyseliny polyakrylovej) sme sa rozhodli pre 2 % koncentráciu.



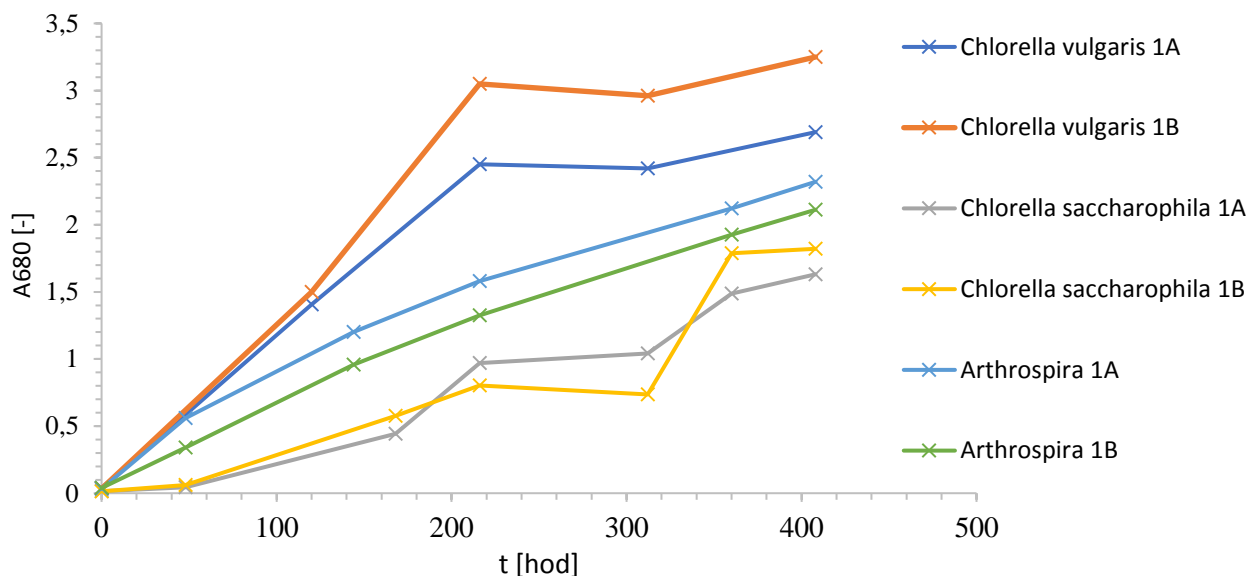
Obrázok 11. Gély vytvorené z extraktov a lipozómov

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto práca bola zameraná na porovnanie obsahu aktívnych látok pri vypestovaných riasach, siniciach a na trhu dostupnom produkte *Chlorella vulgaris*. A tiež testovaniu možnosti ich aplikácie v kozmetickom priemysle.

### 5.1 Optimalizácia kultivácie biomasy

Namerané hodnoty absorbancií v závislosti na dobe rastu sú uvedené v grafe na obrázku 12. U sinice *Arthrospira* bolo náročné stanoviť presnú hodnotu OD, pretože sa usadzovala na stene pyrex fliaš. Chyba merania mohla vzniknúť aj rôznou intenzitou prevzdušňovania. Hodnoty získané sušiny sú uvedené v tabuľke 6.



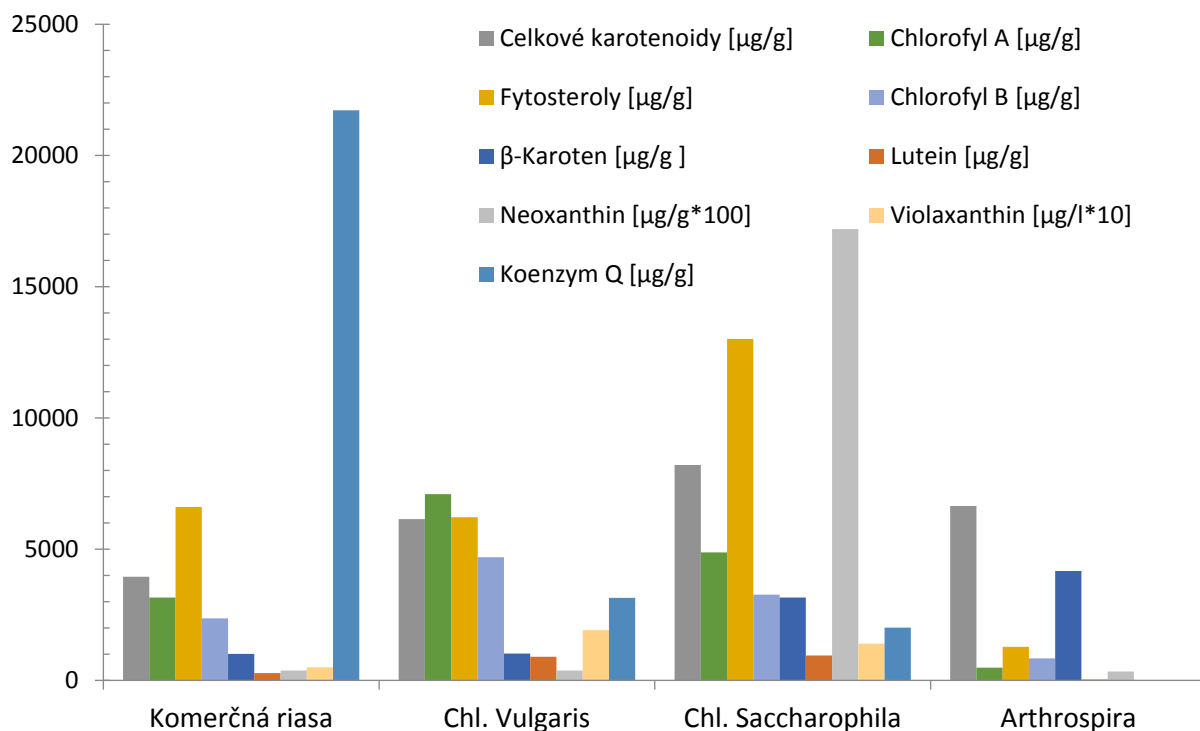
Obrázok 12. Závislosť zmeny optickej hustoty rias a siníc na čase

Tabuľka 6. Obsah sušiny na 4 litre kultivačného média rias a siníc

	Objem biomasy [ml]	Návažka [g]	Doba kultivácie
<i>Chlorella vulgaris</i>	3732	3,2975	17 dni
<i>Chlorella saccharophila</i>	3250	3,4949	17 dni
<i>Arthrospira</i>	3600	7,4827	17 dní

### 5.2 Analýza obsahu karotenoidov - HPLC/PDA

Obsah karotenoidov bol stanovený podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.4 u mikrorias *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, sinica *Arthrospira maxima* a u komerčnej riasy. Zastúpenie pigmentov vo vzorkách je znázornený na obrázku 13.

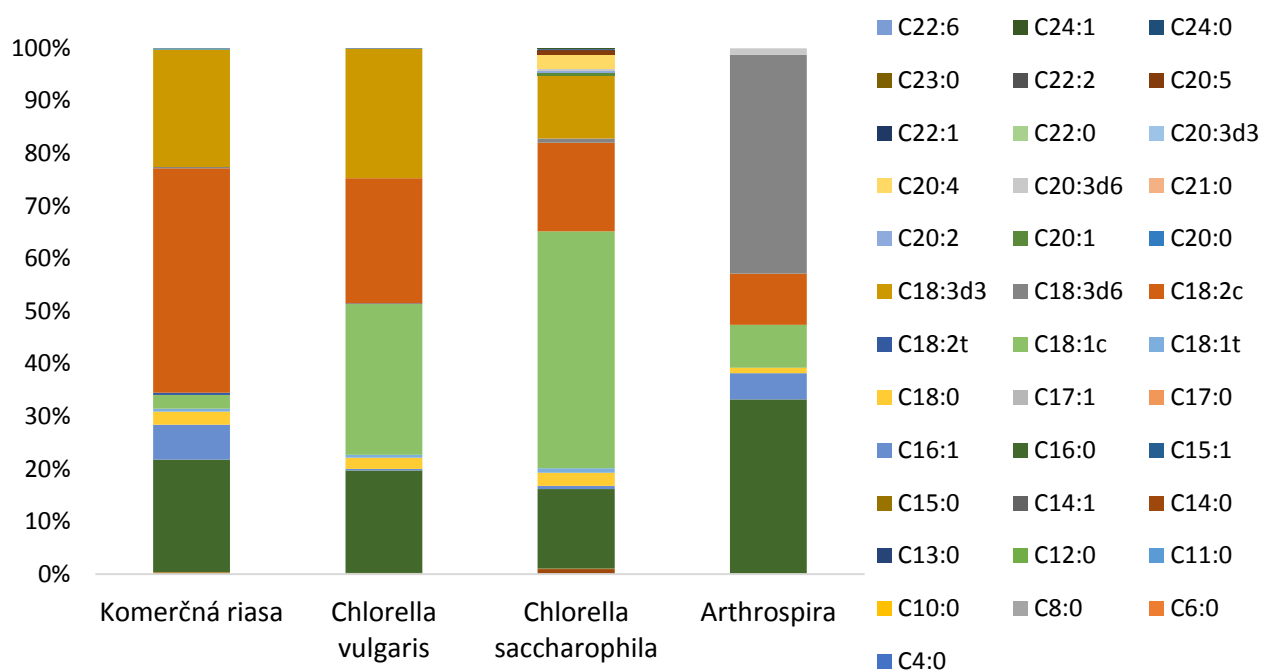


Obrázok 13. Grafické znázornenie produkcie vybraných metabolitov pre rôzne kmene

Z grafu (Obrázok 13) vyplýva, že *Chl. Saccharophila* v porovnaní s ostatnými kmeňmi vykazuje vysoké hodnoty fytosterolov, neoxanthinu a luteínu. Najviac zeleného pigmentu chlorofylu A bolo pri riasie *Chl. vulgaris*. Najznámejší karotenoid, ktorým je β-karotén, bol najviac zastúpený pri sinici *Arthrospira*. Karotenoidy sú prirodzene sa vyskytujúce pigmenty väčšine druhov ovocia, zeleniny a rias. Ľudia nemôžu syntetizovať karotenoidy a musia ich prijímať v potravinách alebo prostredníctvom doplnku stravy. V prvom rade pôsobia ako antioxidanty, napríklad luteín sa uplatňuje pri znižovaní progresie veku a β-karotén má funkciu pro-vitamínu A [35].

### 5.3 Analýza lipidov - plynová chromatografia GC/FID

Obsah lipidov, presnejšie profil mastných kyselín, bol stanovený podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.5 pri mikroriasach *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, sinica *Arthrospira maxima* a u komerčnej riasy. Profil mastných kyselín vo vzorkách je znázornený na obrázku 14.



Obrázok 14. Grafické znázornenie percentuálneho zastúpenia MK pre vybrané kmene

Z grafu (Obrázok 14) vyplýva, že v komerčnej riasy bolo najväčšie zastúpenie ω 6 kyseliny linolovej (C18:2c), ktorá podľa najnovších výskumov pomáha zachovať zdravie bunkových membrán [36]. U riasy *Chl. Vulgaris* a *Chl. Sacharophila* to bola ω 9 kyselina olejová (C18:1c), ktorá sa používa ako súčasť pleťového mlieka, gélu, krému pretože zvlhčuje a zjemňuje pleť. U sinice *Arthrospira* (C18:3d6) to je ω6 kyselina γ–linolenová.

#### 5.4 Charakterizácia extraktov

Analýzovali sme tri druhy extraktov – vodné, alkoholové a olejové, ktoré boli pripravené podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.

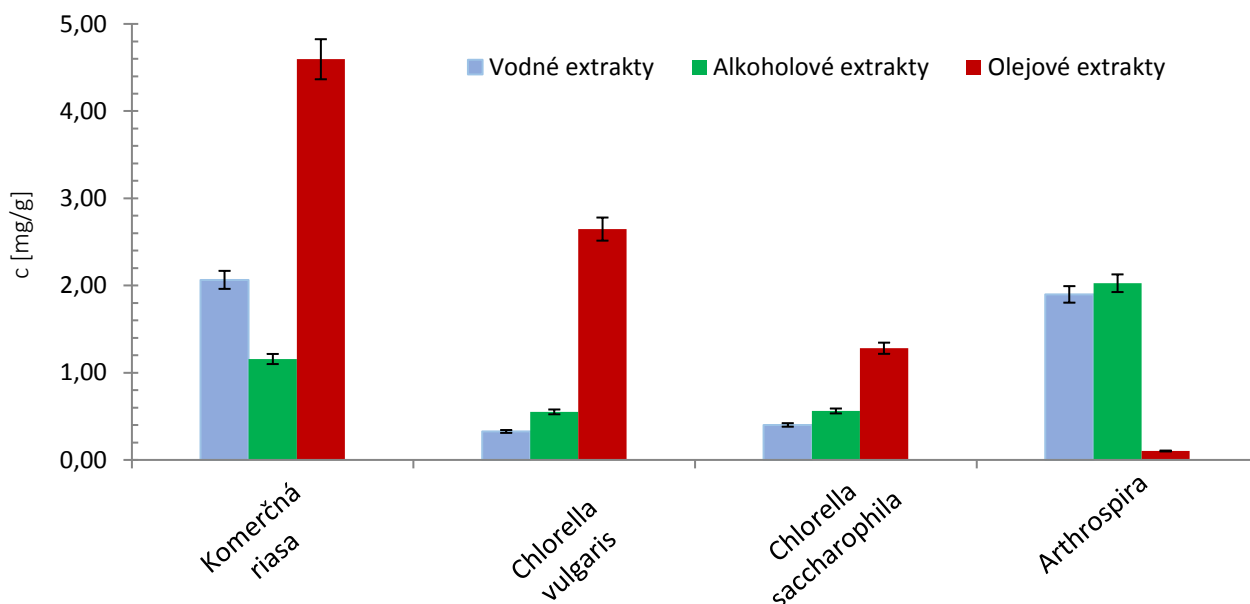
##### 5.4.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Celková koncentrácia polyfenolov bola stanovená spektrofotometricky podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.1 a vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti,  $y = 1,561x$ . Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Výsledná koncentrácia v extraktoch bola prepočítaná na miligramy polyfenolov na gram riasy. Zastúpenie polyfenolov vo vzorkách je znázornený na obrázku 15 a v tabuľke 7.

Tabuľka 7. Hodnoty koncentrácie celkových polyfenolov

	Vodný extrakt	EtOH 20%	Olejový extrakt
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
Komerčná riasa	2,065± 0,208	1,157± 0,007	4,595± 0,273
<i>Chl. vulgaris</i>	0,327± 0,003	0,551± 0,055	2,647± 0,259
<i>Saccharophila</i>	0,401± 0,008	0,562± 0,056	1,281± 0,214
<i>Arthrospira</i>	1,898± 0,032	2,026± 0,203	0,102± 0,044

Vo všeobecnosti najvyššie hodnoty dosahovali olejové extrakty. Pri sinici *Arthrospira* to bol 20 % etanolový extrakt (2,03 mg/g). Najvyšší obsah polyfenolov bol zaznamenaný u olejového extraktu komerčnej riasy (4,60 mg/g).



Obrázok 15. Obsah polyfenolov v extraktoch

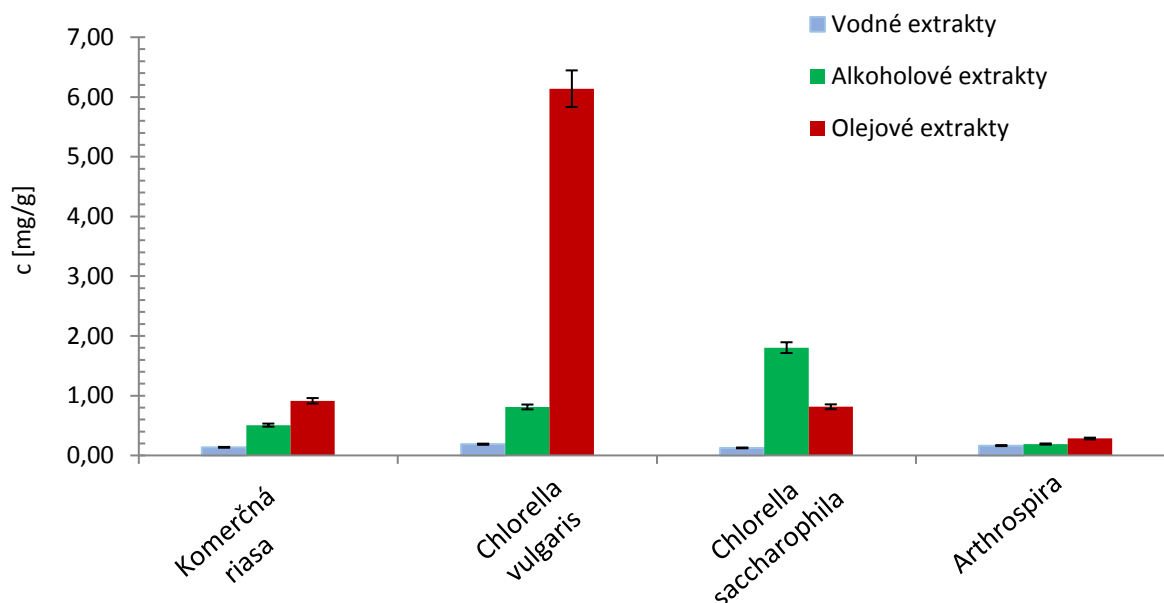
#### 5.4.2 Stanovenie flavonoidov

Celková koncentrácia flavonoidov bola stanovená spektrofotometricky podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.3 a vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti,  $y = 3,0927x$ . Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Výsledná koncentrácia flavonoidov v extraktoch bola prepočítaná na miligramy na gram riasy. Obsah flavonoidov vo vzorkách je znázornený na obrázku 16 a v tabuľke 8.

Tabuľka 8. Hodnoty koncentrácie celkových flavonoidov

	Vodný extrakt	EtOH 20%	Olejový extrakt
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
Komerčná riasa	0,136	0,508	0,915
Chl. vulgularis	0,188	0,812	6,138
Saccharophila	0,126	1,804	0,814
Arthrospira	0,165	0,191	0,283

Z grafu (Obrázok 16) je vidieť, že vypestovaná *Chl. vulgaris* vykazovala najvyšší obsah flavonoidov v olejovom extrakte (až 6,14 mg/g). V prípade alkoholového extraktu to bola *Chl. saccharophila* (1,80 mg/g).



Obrázok 16. Obsah flavonoidov v extraktoch

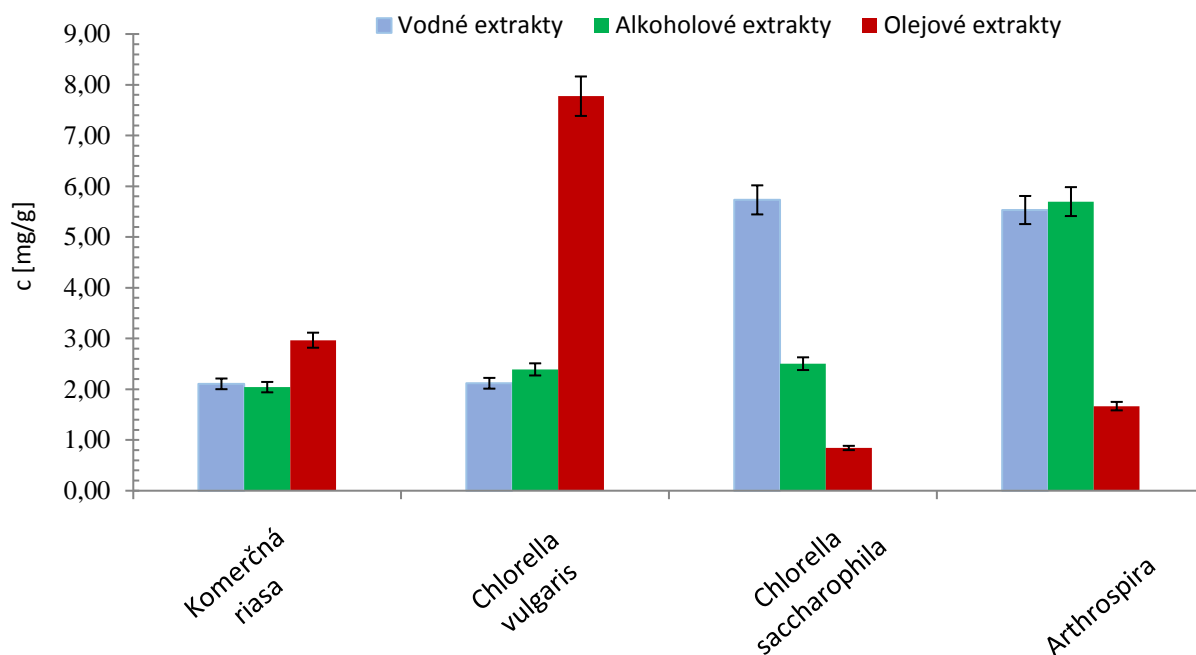
#### 5.4.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity s využitím ABTS

Podľa postupu v kapitole 4.4.2 bola stanovená antioxidačná aktivita a vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti,  $y = 1,1823x$ . Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Výsledná koncentrácia antioxidantov v extraktoch bola prepočítaná na miligramy na gram riasy. Obsah antioxidantov vo vzorkách je znázornený na obrázku 17 a v tabuľke 9.

Tabuľka 9. Hodnoty koncentrácie antioxidačnej aktivity

	Vodný extrakt	EtOH 20%	Olejový extrakt
	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
Komerčná riasa	$2,106 \pm 0,041$	$2,041 \pm 0,012$	$2,966 \pm 0,001$
Chl. vulgaris	$2,117 \pm 0,016$	$2,391 \pm 0,014$	$7,775 \pm 0,083$
Saccharophila	$5,732 \pm 0,031$	$2,504 \pm 0,087$	$0,842 \pm 0,009$
Arthrospira	$5,532 \pm 0,009$	$5,698 \pm 0,007$	$1,667 \pm 0,017$

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje olejový extrakt *Chl. vulgaris*. Naopak najmenší obsah antioxidantov bol nameraný pri olejovom extrakte *Chl. Saccharophila*, pri ktorej bola stanovená aj nízka hodnota polyfenolov a flavonoidov.



Obrázok 17. Antioxidačná aktivita extraktov

### 5.5 Lipozómové častice

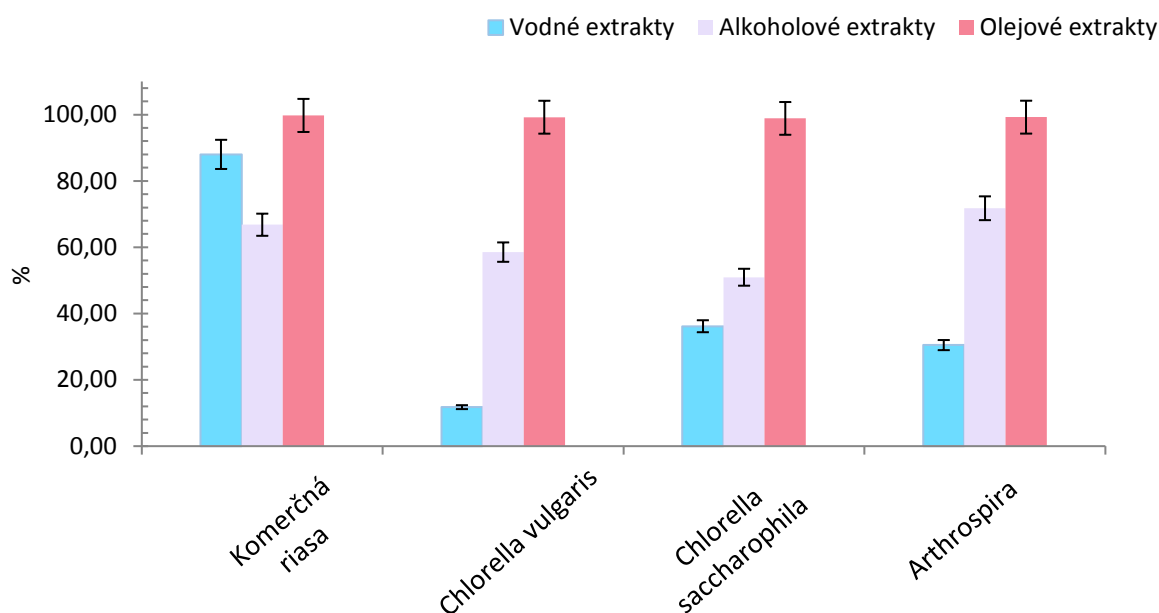
Všetky lipozómy boli pripravené podľa postupu z kapitoly 4.4.6. Enkapsulačná účinnosť bola stanovená podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.6.1. Každá vzorka bola premeraná trikrát. Získané výsledky sú zaznamenané v *tabuľke 10*, enkapsulačná účinnosť je takisto zobrazená na *obrázku 17*.

Tabuľka 10. Enkapsulačná účinnosť

	Vodné lipozómy		Alkoholové lipozómy		Olejové lipozómy	
	cenk[mg/ml]	EU[%]	cenk[mg/ml]	EU[%]	cenk[mg/ml]	EU[%]
<i>Komerčná riasa</i>	0,11	88,00	0,25	66,79	0,58	99,76
<i>Chl. vulgaris</i>	0,47	11,76	0,29	58,53	0,07	99,22
<i>Saccharophila</i>	0,39	36,17	0,33	50,95	0,16	98,86
<i>Arthrospira</i>	0,41	30,48	0,22	71,76	0,25	99,24

Enkapsulačná účinnosť je uvedená v percentách aktívnych zložiek, ktorá sa uzavrela do lipozómov. Z výsledkov je možné vidieť, že najvyššie enkapsulačné účinnosti vykazovali olejové extrakty, a to takmer 100 %. Naopak, najnižšia účinnosť bola zistená u vodného extraktu *Chl. vulgaris* (12 %).





Obrázok 18. Encapsulačná účinnosť pripravených lipozómov

Tabuľka 11. Hodnoty antioxidačnej aktivity lipozómov

	Lipozómy obsahujúce vodný extrakt	Lipozómy obsahujúce extrakt z EtOH 20%	Lipozómy obsahujúce olejový extrakt
	c [mg/ml]	c [mg/ml]	c [mg/ml]
Komerčná riasa	0,602 ± 004	0,584 ± 001	0,473 ± 035
Chl. vulgaris	0,587 ± 005	0,590 ± 001	0,522 ± 004
Saccharophila	0,589 ± 004	0,588 ± 000	0,509 ± 011
Arthrospira	0,548 ± 042	0,525 ± 018	0,510 ± 004

Sledovali sme aj antioxidačnú aktivitu pripravených lipozómov a množstvo uvoľnených polyfenolov. Všetky lipozómy vykazovali veľmi dobré antioxidačné vlastnosti (Tabuľka 11). Podľa tabuľky 12 vieme, že najviac aktívnych látok sa uvoľnilo pri etanolovom extrakte *Arthrospira* (20,82 %). Väčšina častíc však bola stabilná a po dvoch mesačnom skladovaní vo vodnom prostredí sa uvoľnilo iba minimálne množstvo enkapsulovaných aktívnych látok.

Tabuľka 12. Percentuálne zastúpenie uvoľnených aktívnych látok z lipozómov

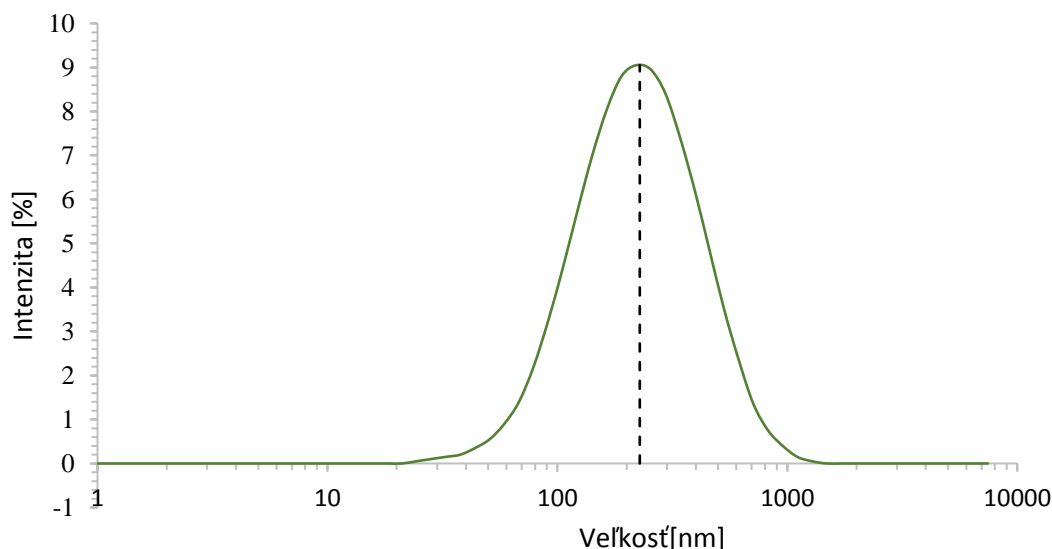
	Vodný extrakt	EtOH 20%	Olejový extrakt
	[%]		
Komerčná riasa	3,88	0,94	6,92
Chl. vulgaris	1,00	1,18	0,00
Saccharophila	0,00	1,36	7,34
Arthrospira	12,66	20,82	0,00

### 5.5.1 Meranie veľkosti lipozómov pomocou DLS a stability pomocou ZP

Všetky pripravené lipozómové častice boli podrobené analýze veľkosti meraním DLS a stability meraním zeta potenciálu podľa postupu z kapitoly 4.4.7. Všetky vzorky boli premerané trikrát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer. Jednotlivé hodnoty veľkostí a polydisperzity

uvádza *Tabuľka 13*, graficky je veľkosť častíc zobrazená na *Obrázok 20*. Pre názornosť je distribúcia veľkosti lipozómov jednej vzorky zobrazená graficky na *obrázku 19*.

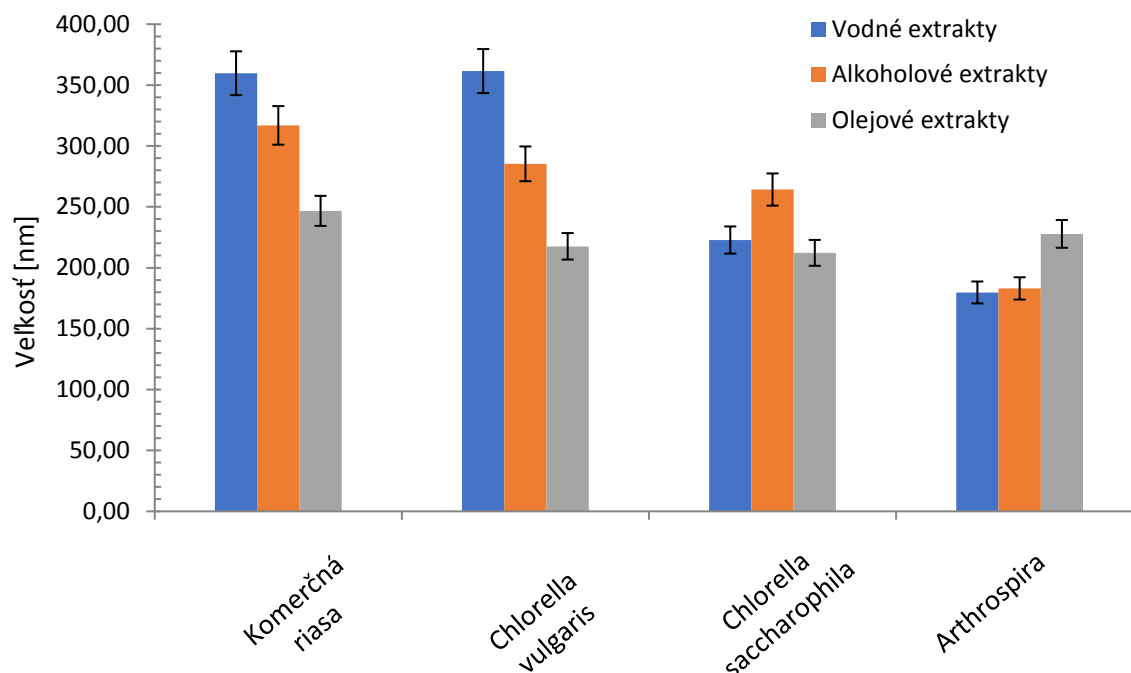
Získané hodnoty zeta potenciálov uvádza *tabuľka 14*, z dosiahnutých hodnôt je možno súdiť, že všetky lipozómy s obsahom lipidových extraktov sú stabilné, keďže u žiadneho z nich nebola získaná absolútna hodnota zeta potenciálu nižšiu, ako 25 mV. Získané dáta zeta potenciálu sú prehľadne graficky znázornené takisto na *obrázku 21*.



Obrázok 19. Veľkosti častíc pre *Saccharophila* v 20% Et-OH

Tabuľka 13. Výsledky merania veľkosti a polydisperzity lipozómov

	Ø Veľkosť [nm]	PDI
Komerčná chlorella VF	359,73 ± 2,79	0,28 ± 0,04
Chlorella vulgaris VF	361,50 ± 3,82	0,39 ± 0,03
Chl. saccharorophila VF	222,77 ± 3,92	0,26 ± 0,01
Arthrospira VF	179,73 ± 2,35	0,42 ± 0,07
Komerčná chlorella EF	316,9 ± 2,14	0,36 ± 0,03
Chlorella vulgaris EF	285,33 ± 2,72	0,40 ± 0,01
Chl. saccharorophila EF	264,23 ± 1,52	0,30 ± 0,03
Arthrospira EF	183,03 ± 2,77	0,23 ± 0,01
Olej komerčná chlorella	246,7 ± 1,48	0,23 ± 0,02
Olej Chlorella vulgaris	217,6 ± 2,33	0,12 ± 0,01
Olej Chl. saccharophila	212,23 ± 2,76	0,16 ± 0,01
Olej Arthrospira	227,8 ± 2,55	0,21 ± 0,01



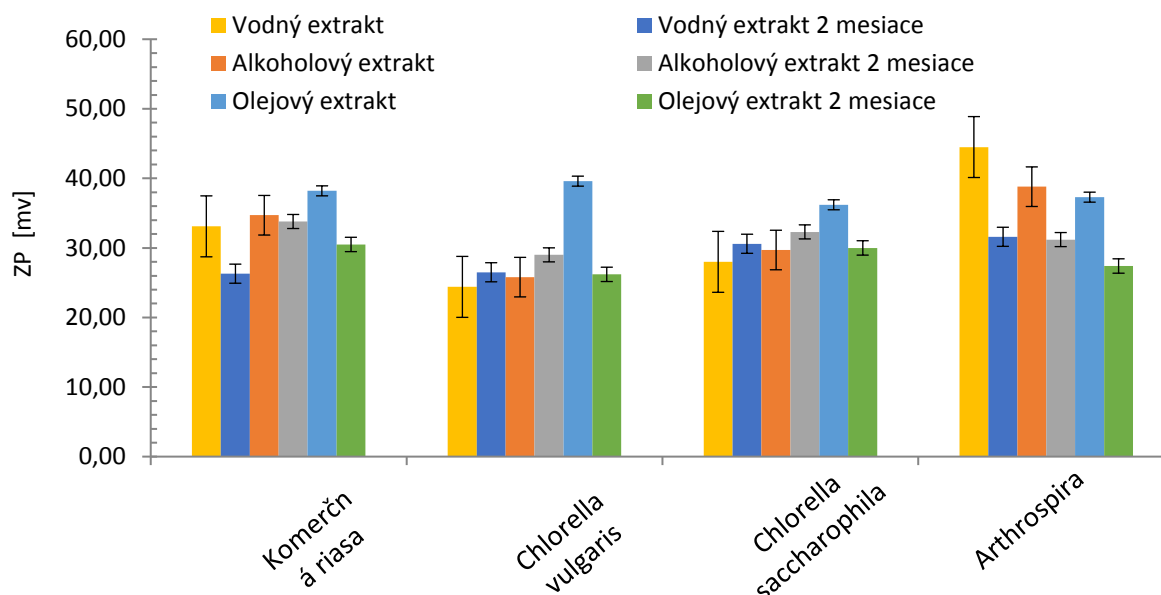
Obrázok 20. Priemerná hodnota veľkosti pripravených nanočastíc

Priemerná veľkosť častíc bola 256,46 nm. Častice boli najmenšie (179,73 nm) pri vodnom extrakte *Arthrospira*. Naopak, najväčšie (361,50 nm) pri vodnom extrakte *Chl. vulgaris*.

Tabuľka 14. Výsledky merania dlhodobej stability lipozómov – absolútna hodnota ZP

	ZP [mV]	ZP [mV] 2 mesiace
Komerčná chlorella VF	33,1 ± 1,1	26,3 ± 1,2
Chlorella vulgaris VF	24,4 ± 1,2	26,5 ± 0,3
Chl. saccharorophila VF	28,0 ± 0,2	30,6 ± 0,4
Arthrospira VF	44,5 ± 0,2	31,6 ± 0,3
Komerčná chlorella EF	34,7 ± 1,3	33,8 ± 1,5
Chlorella vulgaris EF	25,8 ± 0,2	29,0 ± 2,1
Chl. saccharorophila EF	29,7 ± 0,5	32,3 ± 0,7
Arthrospira EF	38,8 ± 1,6	31,2 ± 0,1
Olej komerčná chlorella	38,2 ± 1,2	30,5 ± 2,2
Olej Chlorella vulgaris	39,6 ± 3,7	26,2 ± 1,3
Olej chl. saccharophila	36,2 ± 0,2	30,0 ± 0,1
Olej Arthrospira	37,3 ± 0,5	27,4 ± 0,1

Tabuľka 12 udáva ďalej aj hodnoty zeta potenciálu po dvojmesačnom skladovaní. Z dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že všetky častice boli stabilné aj z hľadiska dlhodobej stability (2 mesiace). Najväčší pokles zeta potenciálu bol zaznamenaný u olejového extraktu *Chlorella vulgaris*.



Obrázok 21. Stabilita pripravených lipozómov- absolútna hodnota zeta potenciálu

## 5.6 Krémy a gély

Krémy a gély boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.5.1. Výsledky antioxidačnej aktivity sú uvedené v *tabuľke 15*. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazoval krém č. 2 a gél č. 3. Krém č. 2 obsahoval 5 ml extraktu komerčnej riasy v 20% Et-OH a 5 ml lipozómov tohto extraktu. Gél č. 3 obsahoval 1 ml alkoholového extraktu *Chl. saccharophila* a 1 ml lipozómov. Celkové zloženie krémov a gélov sú uvedené v *tabuľke 16*.

Tabuľka 15. Antioxidačná aktivita a prepočítané množstvo aktívnych látok v krémoch a géloch

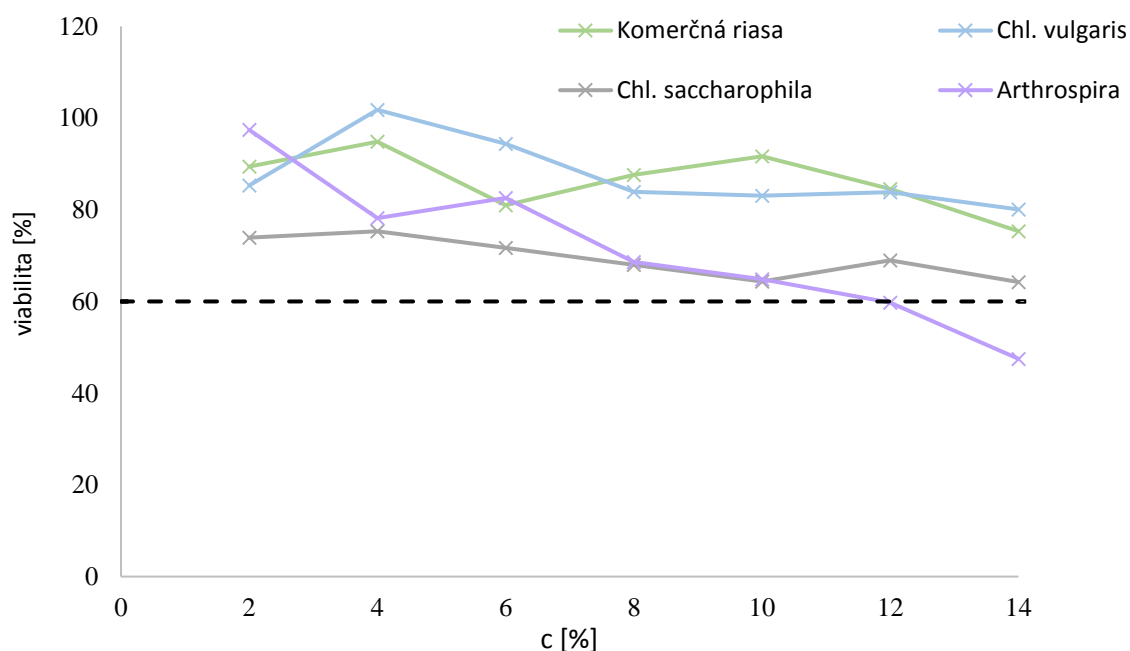
Produkt	Antioxidačná aktivita [mg/g]	Celkové polyfenoly [mg/g]
Krém 1	5,921 ± 0,027	0,091 ± 0,006
Krém 2	21,991 ± 0,001	5,977 ± 0,002
Krém 3	18,044 ± 0,007	0,099 ± 0,001
Krém 4	17,762 ± 0,004	0,528 ± 0,011
Gél 1	0,259 ± 0,005	0,229 ± 0,021
Gél 2	0,296 ± 0,022	0,099 ± 0,002
Gél 3	0,507 ± 0,024	2,054 ± 0,035
Gél 4	0,259 ± 0,028	2,065 ± 0,021

Tabuľka 16. Zloženie krémov a gélov

Krém 1	Extrakt <i>Chlorella vulgaris</i> v 20 % Et-OH 0,61 g; lipozómy <i>Chl. vulgaris</i> v 20% Et-OH 4ml
Krém 2	Extrakt komerčná riasa v 20% Et-OH 5 ml; extrakt komerčná riasa v 20% Et-OH 5 ml
Krém 3	Lipozómy komerčná riasa vodný extrakt 4 ml
Krém 4	Lipozómy <i>Arthrospira</i> vodný extrakt 4 ml
Gél 1	Lipozómy <i>Chl. saccharophila</i> v 20 % Et-OH 4 ml
Gél 2	Lipozómy komerčná riasa vodný extrakt 4 ml
Gél 3	Extrakt <i>Sacharophila</i> v 20 % Et-OH 1 ml; Lipozómy <i>Chl. saccharophila</i> v 20 % Et-OH 1 ml
Gél 4	Extrakt komerčná riasa vodný extrakt 1 ml

### 5.7 MTT test - analýza cytotoxicity

Test cytotoxicity bol zrealizovaný podľa kapitoly 4.4.8. Parametry testu sú uvedené v *tabuľke* 17. Za hraničnú hodnotu viability buniek, kedy testovaná vzorka nie je toxická sa považuje 60 %. Z testovaných extraktov túto podmienku splňuje aj olejový extrakt *Arthrospira* pre koncentráciu 10 % a menej.



Obrázok 22. Viability testovaných buniek pri olejových lipozómoch

Tabuľka 17. Parametry MTT testu

Test	MTT test cytotoxicity
Bunková kultúra	HaCat ( imortalizované kožné bunky- keratinocyty)
Médium	<i>DMEM</i> (Dulbecco'sModifiedEagleMedium)
Pasáž	17,18
Bunková hustota	$2,5 \cdot 10^5$ buniek/ml
Objem na jamku	100 $\mu$ l
Čas expozície	24 hodín
Vlnová dĺžka	562 nm
Program pre vyhodnotenie	Gén 5

Tabuľka 18. Výsledky MTT testu pre testované lipozómy

% roztok lipozómov	Viabilita buniek [%]			
	<i>Komerčná riasa</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. saccharophila</i>	<i>Arhtrospira</i>
Vzorka:				
2	89,44	85,32	73,89	97,42
4	94,84	101,79	75,31	78,17
6	81,00	94,35	71,72	82,55
8	87,62	83,87	67,97	68,64
10	91,64	83,07	64,38	64,85
12	84,54	83,85	69,00	59,78
14	75,32	80,07	64,24	47,49

## 6 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola koncipovaná ako štúdium biologicky aktívnych látok vo vybraných kmeňoch zelených rias *Chorella vulgaris*, *Chlorella sachharophila* a sinice *Arthrospira*. Výsledky boli porovnávané s komerčne dostupným produktom *Chlorella vulgaris*.

Vybrané kmene sme podrobili analýze obsahu pigmentov predovšetkým karotenoidov na HPLC. *Chl. Sacharophila* obsahovala najviac fytosterolov, neoxanthinu a luteínu zo všetkých vzoriek. Zelený pigment chlorofylu A bol zastúpený najmä u riasy *Chl. vulgaris*. Najznámejší karotenoid,  $\beta$ -karotén, sa nachádzal v najväčšej miere pri sinici *Arthrospira*. Pomocou analytickej metódy GC/FID sme následne zmerali profil mastných kyselín. Uplatnenie v kozmetickom priemysle by mala z dosiahnutých výsledkov nájsť najmä vypestovaná riasa *Chl. Vulgaris* a *Chl. Sacharophila*. Obidve sú totiž bohaté na  $\omega$  9 kyselinu olejovú (C18:1c), ktorá sa používa ako súčasť pleťového mlieka, gélu, krému pretože zvlhčuje a zjemňuje pleť.

Ďalej sme analyzovali tri druhy extraktov – vodné, alkoholové (Et-OH 20%) a olejové. Z testovaných extraktov obsahovali olejové extrakty najvyšší obsah polyfenolov, flavonoidov a vykazovali takisto najvyššiu antioxidačnú aktivitu. Pričom komerčná riasa dosiahla najviac polyfenolov (4,59 mg/g) a vypestovaná riasa *Chlorella vulgaris* flavonoidov (až 6,14 mg/g). Na druhú stranu, najnižší obsah antioxidačných látok bol nameraný pri olejovom extrakte *Chlorella Saccharophila* (0,842 mg/g).

Z pripravených extraktov boli pripravené lipozómy, ktoré boli ďalej charakterizované. Priemerná veľkosť lipozómových častíc bola 256,46 nm a hodnota zeta potenciálu -34,19 mV. Všetky častice boli stabilné aj po 2 mesiacoch. Všetky pripravené liposomové častice tiež vykazovali veľmi dobré antioxidačné účinky. Najlepšie enkapsulačné účinnosti vykazovali olejové extrakty, a to takmer 100 %. Naopak najnižšia enkapsulačná účinnosť bola spektrofotometricky stanovená pri vodnom extrakte *Chl. vulgaris* (12%).

Na záver, sme pre aplikácie najvhodnejší olejové lipozómy podrobili MTT testu na bunkovej kultúre HaCat, kde všetky vzorky vo finálnej koncentrácii do 10% boli bezpečné a sú teda použiteľné pre plánované kozmetické aplikácie.

## 7 ZDROJE

- [1] CHOJNACKA, Katarzyna a Se-Kwon KIM. Introduction of Marine Algae Extracts. KIM, Se-Kwon a Katarzyna CHOJNACKA, ed. Marine Algae Extracts [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015, 2015-02-06, s. 1-14. ISBN 9783527679577.
- [2] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1..
- [3] SPOLAORE, Pauline, Claire JOANNIS-CASSAN, Elie DURAN a Arsène ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering [online]. 2006, 101(2), 87-96 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1263/jbb.101.87. ISSN 13891723. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172306705497>
- [4] SAWANT, Sneha Sunil a Varsha Kelkar MANE. Correlating the Anti – Aging Activity with the Bioactive Profile of *Chlorella emersonii* KJ725233; Its Toxicological Studies for a Potential Use in Cosmeceuticals. Pharmacognosy Communications [online]. 2017, 7(4), 152-157 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.5530/pc.2017.4.22. ISSN 22490159.
- [5] JANKOVSKÝ, Libor. Viry, prokaryota, řasy, houby a lišejníky: přehled systému, fytoogeneze a ekologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1997. ISBN 80-210-15551.
- [6] BARSANTI, Laura a Paolo GUALTIERI. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology [online]. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2014 [cit. 2018-04-20]. ISBN 978-143-9867-327.
- [7] VOTRUBOVÁ, Olga. Anatomie rostlin. 3., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1867-8.
- [8] ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [9] RATHOUSKÝ, Václav. *Chlorella pyrenoidosa*: učebnice zelených potravin. Staré Město: Green Ways, 2008. s. 3-8. ISBN 978-80-254-3143-6.
- [10] DALLEN, Maria. Zelené potraviny: když jídlo je naším lékem : mladá pšenice, mladý ječmen, alfalfa, chlorela, spirulina, mořské řasy, zelenina. Praha: Ratio Bona, c2010. ISBN 978-80-254-4590-7.
- [11] MIŠURCOVÁ, L., F. BUŇKA, J. VÁVRA AMBROŽOVÁ, L. MACHŮ, D. SAMEK a S. KRÁČMAR. Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. Food Chemistry [online]. 2014, 151, 120-125 [cit. 2018-11-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.040. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613016646>
- [12] MASOJÍDEK, Jiří. Mikrořasy – solární továrna v jedné buňce. Praha: Academia. Věda kolem nás, 2016. s. 3. ISSN 2464-6245.
- [13] MANDOTRA, S.K., Pankaj KUMAR, M.R. SUSEELA a P.W. RAMTEKE. Freshwater green microalga *Scenedesmus* abundans: A potential feedstock for high quality biodiesel production. Bioresource Technology [online]. 2014, 156, 42-47 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.127. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414000054>
- [14] KHAN, Z., P. BHADOURIA a P. BISEN. Nutritional and Therapeutic Potential of Spirulina. Current Pharmaceutical Biotechnology [online]. 2005, 6(5), 373-379 [cit. 2019-01-22]. DOI: 10.2174/138920105774370607. ISSN 13892010. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=6&issue=5&page=373>
- [15] KOPECKÝ, Jiří, Richard LHOTSKÝ a Jindřiška PAICHLOVÁ. Aktivní látky mikrořas ve výživě. Praha: Academia, 2017. Věda kolem nás. ISSN 2464-6245.
- [16] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [17] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.



- [18] Prospects and challenges in algal biotechnology. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 9789811019494.
- [19] KALIA, Vipin Chandra. Optimization and applicability of bioprocesses. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 9789811068621.
- [20] Food bioactives. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 9783319516370.
- [21] BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [22] KRS, Václav. Materiály. Praha: Informatorium, 2001. s. 45-84. ISBN 80-86073-73-4.
- [23] WAGHMARE, Ashish G., Manoj K. SALVE, Jean Guy LEBLANC a Shalini S. ARYA. Concentration and characterization of microalga proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing* [online]. 2016, 3(1) [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1186/s40643-016-0094-8. ISSN 2197-4365. Dostupné z: <http://bioresources.bioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-016-0094-8>
- [24] ZÁHEJSKÝ, Jiří. Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.
- [25] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [26] MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. Zetasizer Nano Series: User Manual. 1.1. Anglie: Malvern Instruments Ltd., 2004, 1 - 270 s. Dostupné také z: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)
- [27] Ivanov, Michael Robert. Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Iowa, 2011, [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.17077/etd.b78pd4fa
- [28] ERRIDGE, M.V. a A.S. TAN. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1993, 303(2), 474-482 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1006/abbi.1993.1311. ISSN 00039861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986183713111>
- [29] FOTAKIS G., TIMBRELL J.A. (2006): In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, Vol. 160, 171-177.
- [30] BURCZYK, Frank a Aggy GIANNI. Lexikon kosmetiky: od A do Z. Hodkovičky: Pragma, 2003. ISBN 80-7205-939-4.
- [32] SOMMER, Lumír. Základy analytické chemie. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [32] MCMURRY, John. Organická chemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [33] THEIL, Fritz a Fredrik BJÖRKLING. Specificity of Candida antarctica lipase B (SP 435) in the presence of lipase A in a double enantioselective transesterification. *Biotechnology Letters* [online]. 1993, 15(6), 605-608 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/BF00138549. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00138549>
- [34] KRÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. Základy analytické chemie. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.

- [35] EGGERSDORFER, Manfred a Adrian WYSS. Carotenoids in humannutrition and health. Archives of Biochemistry and Biophysics [online]. 2018, 652, 18-26 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.abb.2018.06.001. ISSN 00039861.
- [36] BURNS, Jessie L., Manabu T. NAKAMURA a David W.L. MA. Differentiatingthebiologiceffects of linoleicacidfromarachidonicacid in health and disease. Prostaglandins, Leukotrienes and EssentialFattyAcids [online]. 2018, 135, 1-4 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.plefa.2018.05.004. ISSN 09523278.

## **8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK**

ABTS – 2,2–azinobis(3–ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

BBM – Bold's Basal Medium

DLS – Dynamický rozptyl svetla

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, médium pre testovanie buniek cicavcov

EF – Etanolová fáza

FID – Plameňový ionizačný detektor

GC – Plynová chromatografia

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografia

PBS – Phosphate-buffered saline

PDA – Detektor diódového poľa

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

VF – Vodná fáza

ZP – Zeta potenciál